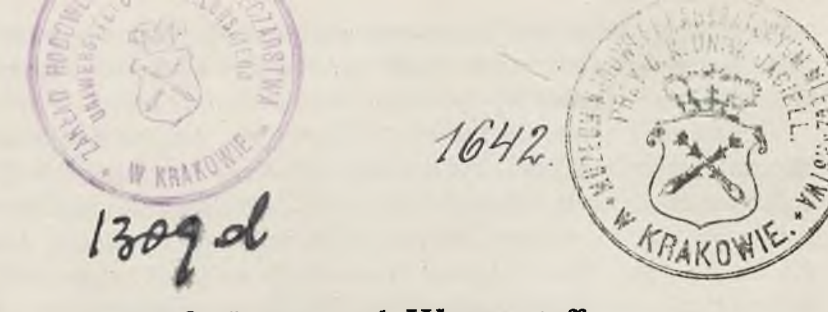


Hefegärung und Wasserstoff.

Von **Sergius Lvoff.**

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der K. Universität St. Petersburg.)

I. Über Chromogene.

Der aus pflanzlichen Organen (Wurzeln der Weißrübe, Fruchtkörpern des Champignons) ausgepreßte Saft enthält chemisch bis jetzt unbekannte Substanzen (sog. Chromogene), die an und für sich farblos sind, aber unter dem Einfluß des Sauerstoffes der Luft schnell schwarze Färbung annehmen: wenn der Saft umgeschüttelt wird oder nur einfach an der Luft steht, verliert er seine anfängliche helle Färbung, wird nach und nach dunkler und erhält zuletzt eine intensiv schwarze Farbe. In einer Arbeit, die wir gemeinsam mit Herrn Professor W. Palladin ausgeführt haben[1]), wurde festgestellt, daß diese schwarze Färbung allmählich verschwindet und der Saft sich wieder aufhellt, wenn man ihm eine gewisse Menge aktiver Hefe zusetzt und das ganze Experiment in sauerstofffreier Luft (im Wasserstoffstrom) ausführt. Bis zum Sieden erhitzte Hefe verliert die Fähigkeit diesen Vorgang auszulösen. Der Wasserstoff an und für sich ist auch nicht imstande, den Saft farblos zu machen. Daraus folgt, daß das wirksame Agens, welches die Aufhellung des Saftes hervorruft, die Hefe selbst und ihre Fermente sind.

Der Vorgang der Aufhellung des Saftes in Gegenwart von Hefe erinnert sehr an den ähnlichen Vorgang mit dem chemisch bekannten Farbstoffe Methylenblau; wie bekannt, verliert dieser Farbstoff in Gegenwart von Hefe langsamer oder schneller seine Färbung in demselben Maße, in dem das Molekül des Methylenblaus sich mit zwei Atomen Wasserstoff verbindet: $M + 2H = MH_2$ (Leukoverbindung). Die Entfärbung des Methylenblaus wird der Einwirkung der Hefenreduktase

[1]) W. Palladin und Sergius Lvoff, Über die Einwirkung der Atmungschromogene auf die alkoholische Gärung, Zeitschrift für Gärungsphysiologie, Bd. 2, 1913, S. 326.

zugeschrieben. Man muß annehmen, daß die Aufhellung der pflanzlichen Säfte bei unseren Versuchen auch zu der Reihe der Reduktionsvorgänge, die von diesen Fermenten hervorgerufen werden, gehört.

Aus der Chemie der Farbstoffe wissen wir, daß die weitaus größere Mehrzahl derselben ihre Pigmenteigenschaften der Anwesenheit einer doppelten Bindung in ihrem Moleküle verdankt (natürlich im Zusammenhange mit einigen anderen Eigentümlichkeiten ihrer Struktur); dabei ruft die Zugesellung zweier Atome Wasserstoff an Stelle dieser doppelten Bindung das sofortige Verschwinden der Pigmenteigenschaften und den Übergang des Farbstoffes in die entsprechende Leukoverbindung hervor[1]).

Die Übereinstimmung dieser Tatsachen macht es sehr wahrscheinlich, daß die Analogie zwischen den pflanzlichen Pigmenten unserer Versuche und den Farbstoffen sich nicht nur auf die qualitative Reaktion in Gegenwart von Hefe beschränkt, sondern daß ihr auch eine innere Analogie in der Struktur entspricht, mit anderen Worten, daß die Chromogene Leukoverbindungen sind, die vermittels der Zugesellung von zwei Atomen Wasserstoff aus Pigmenten entstehen[2]).

$$R + 2H = RH_2.$$

Folglich haben wir den Vorgang der Entfärbung des Saftes als einen Reduktionsvorgang auf Kosten des aktiven Wasserstoffes anzusehen. Das Vorhandensein dieses aktiven Wasserstoffes in dem gärenden Medium wird gewöhnlich als das Ergebnis der Tätigkeit eines besonderen Fermentes, der Reduktase, aufgefaßt. Im weiteren haben wir durch eine Reihe von Versuchen gezeigt, daß der Prozeß der Entfärbung des Saftes (d. h. der Prozeß der Verwandelung des schwarzen Pigmentes in eine Leukoverbindung), der in dem gärenden Medium vor sich geht, deprimierend auf die Alkoholgärung einwirkt: unter diesen Bedingungen findet eine bedeutende Herabsetzung der Mengen beider Komponenten der Gärung, sowohl der Kohlensäure als auch des Alkohols statt, und zwar in äquivalentem Maße. So hat z. B. die Portion, in der im Laufe des Gärungsprozesses eine energische Reduktion der vorher angehäuften Pigmente vor sich ging, 251,2 mg CO_2 und dementsprechend 262 mg Alkohol ausgeschieden; das Verhältnis glich folglich dem Verhältnis von 100 : 104. Eine parallele Portion, in der dank den anaeroben Bedingungen

---

[1]) Siehe z. B. R. Nietzki, Chemie der organischen Farbstoffe, Berlin 1906.

[2]) W. Palladin hat schon früher (W. Palladin, Über die Bedeutung der Atmungspigmente in den Oxydationsprozessen der Pflanzen und Tiere, Zeitschr. f. Gärungsphysiologie, Bd. 1, 1912, S. 91) gerade diese Anschauung über die Chromogene entwickelt, — jetzt findet sie in der von uns festgestellten biochemischen Reaktion mit der Hefe ihre experimentelle Bestätigung.

des Versuches die Chromogene sich nicht in Pigmente verwandeln konnten und eine Reduktion der letzteren nicht stattfand, schied 561,6 mg Kohlensäure und 595 mg Alkohol aus; das Verhältnis war hier also gleich 100 : 106[1]).

Dieses Ergebnis haben wir der Tatsache zugeschrieben, daß der zur Reduktion der Pigmente nötige Wasserstoff von ihnen aus dem gärenden Medium entnommen wird, wo er zum normalen Verlauf der Alkoholgärung nötig ist.

So wahrscheinlich uns auch gerade diese Auffassung der Chromogene und ihrer Einwirkung auf die Alkoholgärung vorkam, unsere Überlegungen bewahrten doch einen gewissermaßen hypothetischen Charakter: die pflanzlichen Säfte stellen ein sehr komplexes biochemisches Medium vor, und man kann nicht immer mit Bestimmtheit behaupten, daß es gelungen wäre, die Einwirkung dieses oder jenes Faktors abzugrenzen.

Deshalb hielt ich es für wesentlich wichtig, unsere Versuche mit den chemisch bekannten Substanzen zu wiederholen, mit denen wir die Chromogene verglichen haben, vor allem mit Methylenblau. Von der Ähnlichkeit der qualitativen Reaktion in Gegenwart von Hefe war schon früher die Rede. Jetzt war es wichtig, sich davon zu überzeugen, ob die Reduktion dieser Farbe in Gegenwart von Hefe denselben Effekt auslöst — eine Deprimierung der Alkoholgärung hervorruft. Hier wollen wir einige Versuche aus einer Reihe ebensolcher anführen, die vollständig ähnliche Resultate ergaben.

Die Methodik der Versuche war dieselbe wie in der früheren Arbeit[1]).

Versuch I: Es wurden im Luftstrom zwei Portionen aufgestellt: I. Die Kontrollportion mit 100 ccm Wasser + 5 g Hefanol + 20 g Saccharose + 2,5 ccm Toluol. II. Die Versuchsportion: dasselbe + 421 mg Methylenblau (nach Ehrlich).

In I. geht die Gärung normalerweise vor sich, in II. wird sie durch den ununterbrochen verlaufenden Reduktionsvorgang des Methylenblaues kompliziert. Der Versuch dauerte 15 Stunden.

	Stunden	CO_2 in mg	Depression	Alkohol in mg	$CO_2 : CH_3CH_2OH$
I. Portion . . .	15	251	0,095°	226	100 : 90
II. Portion . . .	15	136	0,055°	131	100 : 96
II. im Prozentverhältnis zu I. . .	—	54 %	—	58 %	—

[1]) W. Palladin und S. Lvoff, a. a. O.

Versuch II: I. Portion: 100 ccm Wasser + 5 g Trockenhefe nach Lebedew + 20 g Saccharose + 2,5 ccm Toluol. II. Portion: dasselbe + 525 mg Methylenblau.

CO_2 in mg					De- pression	Alkohol in mg	CO_2 : CH_3CH_2OH
Stunden	14	5	24	Im ganzen			
I. Portion .	457,7	101,4	125,3	684,0	0,27 °	643	100 : 94
II. Portion .	241,8	65,1	44,2	351,1	0,135 °	321	100 : 91
II. im Prozentverhältnis zu I.				51 %	—	49 %	—

Versuch III: I. Portion: 100 ccm Wasser + 10 g derselben Hefe + 20 g Saccharose + 2,5 ccm Toluol. II. Portion: dasselbe + 1 g Methylenblau.

CO_2 im mg							Bestimmung des Alkohols		CO_2 : CH_3CH_2OH
Stunden	$2^1/_2$	2	2	17	28	Im ganzen	De- pression	Alkohol in mg	
I. Portion	81,3	185,3	210	801,3	627,7	1905,6	0,74 °	1762	100 : 92
II. Portion	30	55,7	80	552	491,6	1209,3	0,48 °	1142	100 : 95
II. im Prozentverhältnis zu I.						64 %	—	65 %	—

Aus diesen Versuchen ist die Analogie zwischen der Wirkung des Methylenblaues und der Wirkung der pflanzlichen Pigmente auf die Alkoholgärung deutlich zu ersehen: sowohl in ersterem als auch im zweiten Falle wird eine Herabsetzung der Ausscheidung beider Gärungskomponenten, und zwar in äquivalentem Maße, beobachtet. Diese Reihe sowohl quantitativer als auch qualitativer Analogien gibt uns die Berechtigung, einige Überlegungen über die wahrscheinliche chemische Struktur der pflanzlichen Pigmente und Chromogene auszusprechen:

1. Die pflanzlichen Pigmente, mit denen wir zu tun hatten, sind Körper, die in ihrem Molekül wahrscheinlich eine doppelte Bindung enthalten, an deren Stelle zwei Atome Wasserstoff treten können; dabei entsteht aus dem Pigment eine entsprechende Leukoverbindung.
2. Der molekulare Wasserstoff ist nicht imstande, die doppelte Bindung zu lösen, im Wasserstoffstrom entfärben sich die Pigmente nicht.
3. Unter Einwirkung der spezifischen Aktivatoren des Wasserstoffes, — z. B. der Hefenreduktase, — geht dieser Prozeß mit Leichtigkeit vor sich und der Saft entfärbt sich.

4. In der Leukoverbindung, dem Chromogen, ist der Wasserstoff locker gebunden und wird vom molekularen Sauerstoff leicht mit Beihilfe der Oxydasen bis zum Wasser verbrannt.

Schon bei den ersten der oben beschriebenen Versuche wird meine Aufmerksamkeit von folgender Tatsache in Anspruch genommen: die Fixation des beweglichen Wasserstoffes, die dank der Reduktion des Methylenblaus zu einer Leukoverbindung vor sich geht, wird von einer scharf ausgeprägten Herabsetzung des Gärungsvorganges begleitet. Die Reduktion des Methylenblaus in dem gärenden Medium wird aber gewöhnlich der Einwirkung des Fermentes Reduktase[1]) zugeschrieben, der Gärungsprozeß wird von der Einwirkung der Zymase hervorgerufen. Es entsteht sofort der Gedanke an den engen Zusammenhang beider Vorgänge. Diesen Zusammenhang aufzuklären habe ich mir zum Ziel gesetzt.

II. Die Vergärung des Zuckers.

Die Reduktasen, das sind Fermente, die den Wasserstoff aktivieren und unter seiner Mitwirkung Reduktionserscheinungen hervorrufen, haben schon seit langem die Aufmerksamkeit der Forscher in Anspruch genommen. Zahlreiche Einzelbeobachtungen haben, indem sie sich allmählich anhäuften, die große Verbreitung der Reduktasen sowohl im Tier- als auch im Pflanzenreiche festgestellt. Es gibt tatsächlich fast kein einziges Organ, kein einziges Gewebe, in dem man nicht in dieser oder jener Form die Existenz von Reduktionsprozessen beobachten könnte. Ich werde nicht alle die Arbeiten aufzählen, die der Feststellung neuer experimenteller Ergebnisse auf diesem Gebiete gewidmet sind, sondern nur an dem Beispiel der Hefe zeigen, wie verschiedenartig die von ihr hervorgerufenen Reduktionsvorgänge sind.

Die Hefe ist imstande, Schwefel bis zum Schwefelwasserstoff („Philothion Rey-Pailhade“) zu reduzieren[2]), Sulfate in Sulfide, Nitrate in Nitrite zu verwandeln, Selen und Tellur aus ihren Sauerstoffverbindungen auszuscheiden, Farbstoffe (Methylenblau, schwefelsaures Indigo) in Leukoverbindungen zu reduzieren; unlängst wurde darauf hingewiesen,

[1]) Buchner, Zymasegärung, S. 341 u. ff. (M. Hahn, Zur Kenntnis der reduzierenden Eigenschaften der Hefe).

[2]) Beobachtungen von J. Dumas (Ann. de Chemie et de Physique, 5. Serie, t. III, p. 92) und besonders von Rey-Pailhade (Sur un corps d'origine organique hydrogénant le souffre à froid, Compt. rend. Bd. 106, 1888, S. 1683); geschichtlich sind sie deshalb von Wichtigkeit, weil sie den Anstoß zum eifrigeren Studium der Reduktasen gaben.

daß unter Einwirkung der Hefe das Furfurol auf $^2/_3$ in Furilalkohol verwandelt, d. h. reduziert wird[1]) usw. usw. Nicht alle diese Tatsachen haben vom biochemischen Standpunkte aus die gleiche Bedeutung und nicht allen kann man mit Bestimmtheit einen enzymatischen Charakter zuschreiben. In dieser Frage herrscht keine vollständige Einigkeit. In der Mehrzahl der Fälle werden aber die beobachteten Reduktionserscheinungen auf die Einwirkung des einen oder des anderen spezifischen Fermentes zurückgeführt. Philothion, Hydrogenase, Reduktase, Perhydridase, — das alles sind Benennungen von Fermenten, denen in den Reduktionsvorgängen eine wirksame Rolle zugeschrieben wurde. Hierher gehört auch das Schardinger-Enzym, das der frischen Milch die Fähigkeit gibt, in Gegenwart von Aldehyden Methylenblau zu reduzieren[2]). Schon dieses Chaos von Benennungen, dieser Überfluß an parallelen Bezeichnungen allein zeugt einerseits von dem großen Interesse für Reduktionserscheinungen, andererseits von dem Mangel an allgemein anerkannten leitenden Grundsätzen auf diesem Gebiete. In der letzten Zeit aber machen sich Bemühungen bemerkbar, diese vereinzelten Tatsachen zu einem einheitlichen Ganzen zu verbinden, ihnen ein gemeinsames Fundament zu geben. Unter diesen Bemühungen sind besonders zwei Theorien bemerkenswert, die sich voneinander ziemlich scharf unterscheiden. Die eine, rein chemische Theorie von Heffter und seinen Schülern[3]) spricht den Reduktionserscheinungen jeden fermentativen Charakter ab. Die andere, biochemische Theorie von Bach[4]) ist reich an scharfsinnigen Vergleichen und kühnen Analogien; sie verficht den enzymatischen Charakter der Reduktionserscheinungen und vergleicht sie dabei mit der eigentümlichen Gruppe katalytischer Reaktionen, die sich in Gegenwart von Palladium vollziehen.

Nach der Theorie von A. Heffter verdanken die verschiedenen Substanzen tierischer Abkunft ihre Reduktionseigenschaften der Anwesenheit von Stoffen, die eine Sulfhydrylgruppe enthalten: diese Sulfhydrylgruppe (R-SH) verliert sehr leicht ihren Wasserstoff im statu nascendi.

---

[1]) Lintner und Liebig, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 72, 1911, S. 449.

[2]) Trommsdorf, Centralbl. f. Bakter., Bd. 49, 1909, S. 291.

[3]) A. Heffter, Die reduzierenden Bestandteile der Zellen, Medizin.-naturwiss. Archiv, Bd. 1, 1908, S. 81. — A. Heffter, Gibt es reduzierende Fermente im Tierkörper? Archiv f. exper. Pathol. u. Pharmakol., 1908, Suppl., S. 253. — Eine übersichtliche Darstellung der genannten Frage in dem Artikel von Thorsten Thunberg, Die biolog. Bedeutung der Sulfhydrylgruppe, Ergebn. d. Physiol., Bd. 11, 1911, S. 328.

[4]) A. Bach, Zur Kenntnis der Reduktionsfermente, Biochem. Zeitschr., Bd. 31, 1911, S. 443; Bd. 33, 1911, S. 282; Bd. 38, 1912, S. 154. — Siehe auch A. Bach, Der Chemismus der Atmungsprozesse, St. Petersburg, 1912 (russisch).

Die Anwesenheit des locker gebundenen, leicht beweglichen Wasserstoffes bedingt nun gerade, nach der Meinung von Heffter, die Reduktionserscheinungen. Das Prototyp solcher die Sulfhydrylgruppe enthaltender Substanzen ist das Cystein, welches durch Abspaltung des Wasserstoffes in das Bisulfid-Cystin übergeht. Es gelang Heffter tatsächlich mit dem Präparate Cystein in vitro die Mehrzahl der Reduktionsreaktionen, die gewöhnlich der Reduktase zugeschrieben werden (unter anderem die Entfärbung von Methylenblau) auszulösen; gleichzeitig gelang es ihm, mit Hilfe der spezifischen Reaktion für die SH-Gruppe ihre Anwesenheit fast in all den Geweben und Organen nachzuweisen, in denen die Anwesenheit der Reduktase vermutet wurde. Hieraus eben zieht nun Heffter den Schluß, daß es gar keine Reduktase als Ferment gibt und daß sich in den hierher gehörenden Fällen einfach eine ziemlich elementare chemische Reaktion vollzieht. „Will man die reduzierenden Eigenschaften der Gewebe als Wirkungen von Reduktasen oder Hydrogenasen auffassen, so kann man das Cystein geradezu als das Modell eines reduzierenden Fermentes betrachten“ [1]). So verführerisch es auch scheint, diese rein chemische Deutung einer ganzen Gruppe biologischer Vorgänge anzunehmen, immerhin muß man gestehen, daß diese Theorie die beobachteten Tatsachen, die ihrem Wesen nach sehr interessant sind, zu sehr vereinfacht, ihnen eine allzu allgemeine Deutung gibt.

Vor allem fällt der qualitative Unterschied zwischen der Wirkung der Sulfhydrylgruppe und der Reduktase in die Augen. Heffters rein chemische „Reduktasen“ wirken viel schwächer und viel langsamer als die Reduktasen biologischer Herkunft. Um ihre Wirkung gleichwertig zu machen, muß man den ersteren Katalysatoren, z. B. Eisenchlorid, zusetzen.

Straßner [2]), der sonst die Anschauungen Heffters teilt, ist auch genötigt festzustellen, daß in reduzierenden Geweben Katalysatoren vorhanden sind, die die Wirkung der SH-Gruppe beschleunigen. Diese Zuhilfenahme von spezifischen Katalysatoren (Reduktasen?) kann nur als eine Konzession zugunsten der Enzymtheorie angesehen werden.

Bei der Deutung der Reduktionserscheinungen kann man außerdem jetzt, besonders nach den Arbeiten von Bach, das Schardinger-Enzym nicht außer acht lassen. Dieses Enzym gehört auch zu den Reduktasen, ist aber nur in Gegenwart von Aldehyden wirksam und hat in dieser Beziehung gar keinen Zusammenhang mit der Sulfhydrylgruppe.

---

[1]) A. Heffter, Medizin.-naturwiss. Archiv, a. a. O.

[2]) W. Straßner, Die reduzierenden Wirkungen des Gewebes, Biochem. Zeitschr. Bd. 29, 1910, S. 295.

Aus den weiter beschriebenen Versuchen endlich ist der enge Zusammenhang zwischen den Gärungserscheinungen und den Reduktionsprozessen vollständig klar; vom Standpunkte der Heffterschen Theorie ist dieser Zusammenhang unerklärlich, oder man müßte die vollständig unwahrscheinliche Voraussetzung machen, daß die Sulfhydrylgruppe im Prozesse der alkoholischen Spaltung der Hexose eine gewisse Rolle spielt.

Die biochemische Theorie von Bach nimmt eine ebensolche Zusammensetzung der Reduktasen wie der Oxydasen an: letztere bestehen aus dem wirksamen Ferment, der Peroxydase, und dem Coferment Oxygenase; die Reduktasen bestehen aus dem aktiven Ferment, der Perhydridase (mit dem Schardinger-Enzym identisch) und dem entsprechenden Coferment (z. B. dem Aldehyden). In den Oxydasen nimmt das Coferment molekularen Sauerstoff an sich, aktiviert letzteren zum Zwecke der inneren Oxydation und bildet auf diese Weise die Grundlage der aeroben Vorgänge, die reine Oxydationserscheinungen sind. In den Reduktasen verbindet sich das Coferment mit dem Sauerstoff des Wassers, aktiviert dabei den Wasserstoff zum Zwecke der inneren Reduktion und bildet auf diese Weise die Grundlage der anaeroben Vorgänge, bei denen Oxydation und Reduktion nebeneinander und streng parallel verlaufen. Bach[1]) gelang es außerdem, eine rein chemische Reaktion (Oxydation der hypophosphorigen Säure) ausfindig zu machen und zu studieren, bei der die Oxydation und Reduktion auf Kosten des Wassers unter der Einwirkung des die Rolle eines Katalysators spielenden Palladiums, des Analogons der Perhydridase, vollständig parallel verlaufen.

In der neuesten Zeit hat Wieland[2]) eine ganze Reihe analoger Reaktionen studiert, bei denen die Oxydation in Abwesenheit von Sauerstoff, d. h. unter anaeroben Verhältnissen zustande kommt; dabei ist aber die Anwesenheit eines Körpers, der den parallel sich befreienden Wasserstoff fixieren (d. h. reduziert werden) könnte, unumgänglich notwendig.

Diese bemerkenswerten Reaktionen[3]) erinnern tatsächlich an die Reaktionen, die mit der Wirksamkeit der Reduktase verbunden sind.

---

[1]) A. Bach, Ber. d. D. chem. Gesellsch., Bd. 42, 1909, S. 4463.

[2]) H. Wieland, Ber. d. D. Chem. Gesellsch., Bd. 45, 1912, S. 484, 679, 685, 2606. Viel früher hat A. Faworsky, Untersuchungen über die isomorphen Verwandlungen in der Reihe der Karbonilverbindungen usw., 1895 (russisch), eine Reihe Reaktionen studiert, die ihrem Wesen nach den obengenannten vollständig analog sind, aber zu der Zeit nicht über die Grenzen des Gebietes der Chemie bekannt wurden.

[3]) Auf die Bedeutung der Arbeiten von Wieland für die Biologie hat unter anderen W. Palladin, Biochem. Zeitschr., Bd. 49, 1913, S. 381 hingewiesen.

Schon aus dieser Charakteristik der Reduktasen ist klar zu ersehen, wie wichtig sie für das Verständnis der Anaerobiose sind, die die Grundlage der wichtigsten biologischen Vorgänge, u. a. des Prozesses der Alkoholgärung, ist. Die Gärung ist ein anaerober Vorgang — das ist schon seit Pasteur bekannt; es ist außerdem bekannt, daß seine Endprodukte oxydierter Kohlenstoff (in Form von CO_2) und reduzierter Kohlenstoff (in Form von $CH_3 \cdot CH_2OH$) sind. Nach Entdeckung der Zymase wurde durch direkte Versuche bewiesen, daß die Zymase auch außer der lebenden Zelle, sowohl in Gegenwart, als auch in Abwesenheit von Sauerstoff, ganz gleichmäßig arbeitet, d. h. sich zu letzterem völlig indifferent verhält[1]). Auf diese Weise ist für den Chemismus der Gärung folgendes kennzeichnend: 1. der anaerobe Verlauf des Vorganges und 2. das gleichzeitige Vorhandensein von Oxydations- und Reduktionsprozessen: d. h. gerade die Eigentümlichkeiten, die nach der Theorie von Bach die Wirksamkeit der Reduktasen kennzeichnen.

Diese Tatsache konnte natürlich nicht unbeachtet bleiben und trotz der Verschiedenheit der Umrisse, die zur Erklärung des Chemismus der Alkoholgärung aufgestellt wurden, enthalten alle, schon von Baeyer angefangen[2]), die gleiche, ihnen allen gemeinsame Idee — alle erkennen die Notwendigkeit an, den Prozeß der Spaltung der Hexose als einen doppelseitigen Prozeß anzusehen, der aus den parallel verlaufenden, chemisch einander entgegengesetzten Vorgängen der Oxydation und Reduktion besteht, die sich nur auf verschiedene Teile eines und desselben Moleküls beziehen. Diese Bipolarität der Reaktion bildet gerade den fast jedem Gärungsschema gemeinsamen Gedanken; andererseits aber bildet dieselbe Bipolarität das Wesen der Reaktion, in deren Brennpunkt als wirksames Agens die Reduktase oder ihr chemisches Analogon, das Palladium, steht.

Bei dieser nahen Verwandtschaft der Ideen, die die Grundlage der Vorstellung vom Wesen des Gärungsvorganges und des Reduktionsprozesses bilden, kann es sogar verwundern, daß die Reduktase verhältnismäßig vor gar nicht langer Zeit erst als der wirksame Faktor im Gärungsprozesse anerkannt wurde.

Im Jahre 1897 hat Hahn[3]) vermittels einer ganzen Reihe von Versuchen mit dem Buchnerschen Hefenpreßsafte den fermentativen

---

[1]) Gromow und Grigoriew, Die Arbeit der Zymase und der Endotryptase in den abgetöteten Hefezellen, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 42, 1904, S. 299.

[2]) Baeyer, Ber. d. D. Chem. Gesellsch., Bd. 3, 1870, S. 74.

[3]) E. Buchner (und Hahn), Zymasegärung, S. 344.

Charakter der Reduktion des Methylenblaus festgestellt und dabei auf den bemerkenswerten Parallelismus in der Schwächung der Energie der Zymase und Reduktase hingewiesen. Diese Beobachtungen bewogen ihn, die Existenz der Reduktase als eines besonderen Fermentes zu bezweifeln.

Der Gedanke von dem aktiven Anteile der Reduktase an den Gärungsprozessen wurde, wenn ich mich nicht irre, in bestimmter Form zum ersten Male im Jahre 1904 von Grüß ausgesprochen. Er hat vermittels direkter Versuche nachgewiesen, daß die Reduktion der Schwefelblüte zu SH_2, die von der Hefehydrogenase hervorgerufen wird, von einer Verminderung der Ausscheidung von Alkohol begleitet wird, weil der zum normalen Verlauf des Gärungsprozesses nötige Wasserstoff künstlich abgeführt wird[1]). Im Jahre 1908 hat W. Palladin auf Grund seiner Versuche über die Reduktion von Natriumselenit und Methylenblau sich nicht weniger bestimmt für die aktive Rolle der Reduktase im Gärungsprozesse ausgesprochen[2]). Später hat Palladin im Zusammenhange mit seiner Theorie der Atmungschromogene diesen Gedanken weiterentwickelt und ihn zur Grundlage seiner Anschauungen über das Wesen der Gärungs- und Atmungsprozesse gemacht[3]). In den letzten Arbeiten von S. Kostytschew[4]) und A. Lebedew[5]) bildet die Idee von der Reduktase, die als wirksames Agens der Alkoholgärung aufgefaßt wird, die Grundlage der von ihnen aufgestellten Schemata; besonders prägnant ist diese Idee im Schema von S. Kostytschew durchgeführt; dieses Schema hat auch in bedeutendem Maße als Stützpunkt für meine Arbeit gedient[6]).

---

[1]) J. Grüß, Untersuchungen über Atmung und Atmungsenzyme der Hefe, Zeitschr. f. d. gesamte Brauwesen, Bd. 27, 1904, S. 686.

[2]) W. Palladin, Beteiligung der Reduktase im Prozesse der Alkoholgärung, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 56, 1908, S. 81.

[3]) W. Palladin, Über die Bedeutung der Atmungspigmente in den Oxydationsprozessen der Pflanzen und Tiere, Zeitschr. f. Gärungsphysiologie, Bd. 1, 1912, S. 81.

[4]) S. Kostytschew, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 79, 1912, S. 143; Bd. 83, 1913, S. 93.

[5]) A. Lebedew, Ber. d. D. Chem. Gesellsch., Bd. 45, 1912, S. 3267; Biochem. Zeitschr., Bd. 46, 1912, S. 488; desgleichen A. Lebedew, Chemische Untersuchungen über die extracellulare Alkoholgärung, Novotscherkassk, 1913 (russisch).

[6]) Erst unlängst wurde die interessante Arbeit von Chowrenko, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 80, 1912, S. 253 veröffentlicht: der Verfasser hat die Reduktion von S bis zu SH_2 in sterilen Hefekulturen quantitativ bestimmt und gefunden, daß die Reduktion des Schwefels nach Beendigung der Hauptperiode der Gärung ihr Maximum erreicht.

Trotz der erhöhten Aufmerksamkeit, die in der letzten Zeit der Reduktase gewidmet wird, hat das Studium der Frage ihres Anteils an dem Gärungsprozesse in experimenteller Hinsicht seit den ersten Versuchen keine wesentlichen Fortschritte gemacht. Der Hauptgrund besteht, wie es mir scheint, gerade in der Bipolarität der Reaktion, weil diese Bipolarität den Vorgang bedeutend kompliziert. Aber schon die ersten älteren Versuche geben den direkten Hinweis, in welcher Richtung wir hier experimentell vorgehen müssen: es ist klar, daß wir auf irgend eine Weise die Bipolarität zerstören müssen, indem wir einen Teil der korrelativen Reaktionen von dem Grundvorgange ablenken. Auf diese Weise stellt das Experiment folgende Aufgabe: 1. die streng quantitative — in Gewichtseinheiten ausgedrückte — Bestimmung des Wasserstoffes, der künstlich aus dem gärenden Medium entfernt wird, und 2. die ebenso quantitative Bestimmung der Gärungsprodukte, deren Menge bei Zerstörung der natürlichen Bipolarität der Reaktion ein Defizit ergeben muß. Schon nach den ersten Versuchen war es für mich klar, daß man mit Hilfe von Methylenblau zur Bestimmung der quantitativen Verhältnisse zwischen diesen beiden parallelen Vorgängen gelangen kann.

Die Entfernung des Wasserstoffes wurde in meinen Versuchen vermittels des Methylenblaus rektif. (nach Ehrlich) oder des Kahlbaumschen Präparates „Zinkfreies Methylenblau" (vom 14. Versuch an) bewerkstelligt. Beide Präparate gaben die gleichen Ergebnisse.

Die Versuche wurden unter streng anaeroben Verhältnissen durchgeführt, und zwar im Wasserstoffstrom, der im Apparat von Bardeleben (Wirkung von H_2SO_4 auf metallisches Zink) gewonnen wurde. Bei jedem Versuch wurden nicht weniger als zwei Portionen aufgestellt. Für jede Portion wurde eine streng bestimmte Menge Trockenhefe (Hefanol, Dauerhefe nach Lebedew) abgewogen oder vermittels einer Pipette eine bestimmte Quantität Saft, gewonnen durch Mazeration nach Lebedew, abgemessen. Alle Bedingungen waren für beide Portionen vollständig gleich, nur erhielt die Versuchsportion zum Unterschied von der Kontrollportion eine bestimmte, genau abgewogene Menge Methylenblau. Der Versuch wurde bis zu der vollständigen Entfärbung des Methylenblaus durchgeführt, das letztere ging dabei in die Leukoverbindung über und war dank den anaeroben Bedingungen des Versuches nicht imstande, wieder oxydiert zu werden.

Mit anderen Worten, die gegebene Menge Methylenblau konnte nur einmal reagieren und dabei eine streng bestimmte Menge Wasserstoff

binden. Es war nicht schwer, diese Menge nach den molekularen Korrelationen zu berechnen. Auf diese Weise wurde die Menge des Wasserstoffes, der im Verlaufe des Versuches aus dem gärenden Medium entfernt wurde, ganz genau — in Gewichtseinheiten — festgestellt. Zu der gleichen Zeit wurde vermittels der Pettenkofferschen Röhren die Kohlensäure der Gärung bestimmt[1]). Die Portion mit Methylenblau ergab immer weniger CO_2 als die Kontrollportion; nach diesem Unterschiede konnte man darüber urteilen, welche Quantität von Hexose auf den ersten Stufen der Spaltung stehen geblieben war. Da der Versuch sofort nach der Entfärbung des Methylenblaus abgebrochen werden mußte und dieses oft auf dem Höhepunkte der Gärung geschah, wenn die Ausscheidung der Kohlensäure sehr intensiv vor sich ging, so mußte sorgfältig darauf geachtet werden, daß im Momente der Unterbrechung des Versuches beide Portionen wirklich miteinander vergleichbar waren. Zu diesem Zwecke benutzte ich folgenden Handgriff: wenn die völlige Entfärbung eingetreten war, verschloß ich den Bardelebenschen Apparat und fuhr fort, vermittels des Aspirators das Gas durch die Röhren zu entfernen, bis die Ausscheidung von Blasen aufhörte; auf diese Weise erreichte ich den gleichen Grad des Innendruckes in beiden Kolben. Darauf trennte ich nun vermittels Klemmen die Gärungskolben von den mit Barytwasser gefüllten Röhren und ließ von neuem Wasserstoff einströmen; der letztere drang heftig in die Kolben ein, in denen der Druck niedrig war, und schüttelte dabei die Flüssigkeit stark um. Auf diese Weise wurde die Gefahr der Übersättigung mit CO_2 beseitigt. Diese Operationen wiederholte ich mehrmals bevor ich den Versuch abbrach. Den Alkohol bestimmte ich nach den entsprechenden Destillationen meistenteils vermittels der kryoskopischen Methode[2]), in einzelnen Fällen vermittels der Methode von Nicloux[3]).

Bei Aufstellung meiner Versuche stützte ich mich auf das unlängst von S. Kostytschew aufgestellte Schema[4]).

---

[1]) Die Methodik ist in der Arbeit von W. Palladin und S. Kostytschew, Methoden zur Bestimmung der Atmung der Pflanzen (Abderhalden, Handbuch d. biochem. Arbeitsmeth., Bd. 3, 1910, S. 479) beschrieben. Bei reichlicher Ausscheidung von CO_2 war ich sehr oft genötigt an den Pettenkofferschen Röhren noch einige Kolben mit Barytwasser anzubringen.

[2]) Ebenso wie in der früheren Arbeit von W. Palladin und S. Lvoff, a. a. O.

[3]) Beschrieben in dem Artikel von Pringsheim (Abderhalden, Handbuch d. biochem. Arbeitsmeth., Bd. 2, S. 7).

[4]) S. Kostytschew, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 79, 1912, S. 143.

Dieses Schema wird, wie bekannt, auf folgende Weise formuliert:

$$C_6H_{12}O_6 = 2CH_3CO\,COOH + R\begin{matrix} H \\ H \\ H \\ H \end{matrix} \quad \ldots\ldots \quad \text{I.}$$

$$2CH_3COCOOH = 2CH_3COH + 2CO_2 \quad \ldots\ldots \quad \text{II.}$$

$$2CH_3COH + R\begin{matrix} H \\ H \\ H \\ H \end{matrix} = 2CH_3CH_2OH + R \quad \ldots \quad \text{III.}$$

Die Grundidee des Schemas, die Idee von der Rolle der α-Ketonsäure und des Azetaldehydes in dem Prozesse der Alkoholgärung ging mich gar nichts an. Das Schema interessierte mich nur insofern, als es für mich zum Stützpunkte meiner vorläufigen Berechnungen dienen konnte, welche quantitativen Verhältnisse ich bei meinen Versuchen erwarten durfte. Aus der ersten Gleichung, die die Vorstellung des Autors von dem Anfangsstadium der Alkoholgärung ausdrückt, war zu ersehen, daß ein Hexosemolekül unter Einwirkung der Reduktase vier Atome Wasserstoff abgibt, die später (Gleichung III) zurückkehren, um den Prozeß der Spaltung der Hexose bis zu ihrem normalen Endprodukte — dem Alkohol — zu Ende zu führen. Die zweite Gleichung zeigt, daß die zweite Komponente — CO_2 — zu ihrer endgültigen Abspaltung keine Rückkehr des Wasserstoffes erfordert. Schon meine ersten Versuche hatten mich ebenso wie meine frühere Arbeit [1]) darauf vorbereitet, anzunehmen, daß dieser Wasserstoff, der zeitweilig von der Reduktase gebunden wird, zur normalen Ausscheidung beider Komponenten und nicht nur des Alkohols allein nötig ist. Deshalb habe ich, während ich meine Versuche anfing und mich auf die erste Gleichung des Schemas von S. Kostytschew stützte, folgende Voraussetzung gemacht: wenn ich die vier zeitweilig von der Reduktase fixierten Atome Wasserstoff ablenke und sie daran verhindere, weiter am Gärungsprozesse teilzunehmen, so wird dadurch ein Hexosemolekül, das schon in das erste Gärungsstadium hereingezogen war, von der weiteren Spaltung abgehalten und die Gesamtsumme der ausgeschiedenen Kohlensäure und des Alkohols wird gerade um zwei Moleküle des einen und des anderen Bestandteiles vermindert. Ein derartiges Hexosemolekül, das auf dem ersten Stadium seiner Spaltung stehen geblieben ist, werde ich der Kürze halber als ein inaktiviertes Molekül bezeichnen. Indem ich also aus dem gärenden Medium

[1]) W. Palladin und S. Lvoff, a. a. O.

vier Atome Wasserstoff entfernte, dachte ich ein Molekül Hexose zu inaktivieren [1]).

Es erwies sich, daß zur Inaktivierung eines Hexosemoleküls nur zwei Atome Wasserstoff abgelenkt werden mußten, was mit Hilfe nicht zweier, sondern bloß eines Methylenblaumoleküls bewerkstelligt wird. Dementsprechend enthielt die Grundproportion, die ich in jedem einzelnen Versuch zur Berechnung der Ergebnisse benutzte, folgendes Aussehen: $373{,}8 : 88 = M : \alpha$, d. h. $\alpha = M \times 0{,}2354$. M bedeutet hier die in jedem einzelnen Versuch genommene Quantität Methylenblau, α das voraussichtliche Defizit des CO_2 in der Versuchsportion im Vergleich zu der Kontrollportion. Die entsprechende Proportion zur Bestimmung des Quantums des abgelenkten Wasserstoffes hat folgendes Aussehen:

$$373{,}8 : 2{,}016 = M : \alpha; \quad \alpha \text{ gleicht folglich } M \times 0{,}0054.$$

Versuch IV. Zu jeder von den zwei Portionen wurden auf 100 ccm Wasser 25 g Saccharose + 5 g Trockenhefe nach Lebedew [2]) + 2,5 ccm Toluol genommen. Der II. Portion wurden außerdem 556,3 mg Methylenblau zugesetzt. Nach etwas mehr als 24 Stunden trat vollständige Ent-

---

[1]) Ein Molekül Methylenblau entzieht dem gärenden Medium, indem es sich entfärbt, zwei Atome Wasserstoff ($M + H_2 = MH_2$). Folglich entziehen zwei Moleküle vier Atome Wasserstoff, inaktivieren ein Hexosemolekül und verringern die Ausscheidung von CO_2 in der Versuchsportion im Vergleich zu der Kontrollportion um $2\,CO_2$. Die Formel des Methylenblaus lautet: $C_{16}H_{18}N_3SCl + 3\,H_2O$. (In meiner vorläufigen Mitteilung, Berichte d. D. Botan. Gesellsch., Bd. 31, 1913, S. 141.) Sein Molekulargewicht beträgt 373,8. Folglich müssen $2 \times 373{,}8 = 747{,}6$ mg Methylenblau die Ausscheidung von CO_2 um $2 \times 44 = 88$ mg verringern. Die Umrechnung auf eine beliebige Quantität Methylenblau bietet nun keine Schwierigkeiten. So wurden in dem vierten Versuche 556,3 mg Methylenblau genommen. Ich rechnete also darauf, daß das Defizit in der Ausscheidungsmenge von CO_2 nach folgender Proportion gleich x sein würde: $747{,}6 : 88 = 556{,}3 : x$, $x = 65{,}4$. Statt dieses Unterschiedes erhielt ich einen doppelt so großen = 133,5. Dasselbe wiederholte sich mit unbedeutenden Schwankungen auch bei den folgenden Versuchen. Ich habe alle meine Zahlenangaben (sowohl in der Ausgangsproportion als auch in den Zusätzen) auf das wasserfreie Salz umgerechnet und dabei angenommen, daß ein Methylenblaumolekül zwei Moleküle kristallinischen Wassers enthält (siehe Wichern, Zur quantitativen Bestimmung der Reduktionskraft von Bakterien und tierischen Organen, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 57, 1908, S. 365), das sich bei 105° (in der Mitteilung war ein Druckfehler — 150°) abspaltet. Aus der Arbeit von Bernthsen (Studien in der Methylenblaugruppe, Liebigs Ann. d. Chemie, Bd. 230, 1885) erfuhr ich später, daß es noch ein drittes Molekül H_2O enthält, welches sich erst bei 130—150° abspaltet. Jetzt mache ich keine Umrechnung auf das wasserfreie Salz und nehme als Ausgangspunkt einfach das Salz, welches $3\,H_2O$ enthält. Deshalb unterscheiden sich die unten angeführten Zahlen von den Zahlenangaben der vorläufigen Mitteilung.

[2]) Von Schroeder aus München bezogen.

färbung ein und der Versuch wurde abgebrochen. Bei Bestimmung des Alkohols wurde das letzte Destillat sowohl in diesem, als auch in den folgenden Versuchen bis zu 100 ccm gebracht.

CO_2 in mg ausgeschieden					Bestimmung des Alkohols		$CO_2 : CH_3CH_2OH$
Stunden	5	15,5	6	Im ganzen	Depression	Alkohol in mg	
I. Kontrollportion	235	445	54	734	0,29°	690	100 : 94
II. Versuchsportion	125	388,5	87	600,5	0,24°	571	100 : 95

Die Quantität des Wasserstoffes, der der II. Portion entzogen wurde, entsprach: $H_2 = 556,3 \times 0,0054 = 3,004$ mg.

Der Unterschied in der Ausscheidungsmenge von CO_2 sollte nach der Proportion berechnet gleich $\alpha = 556,3 \times 0,2354 = 130,9$ mg sein. Tatsächlich betrug der Unterschied in diesem Versuch $734 - 600,5 = 133,5$.

Versuch V. I. Die Kontrollportion enthielt: 100 ccm Wasser + 25 g Saccharose + 5 g derselben Hefe + 2,5 ccm Toluol. II. Die Versuchsportion enthielt dasselbe + 2225,2 mg Methylenblau.

CO_2 in mg ausgeschieden								Bestimmung des Alkohols		$CO_2 : CH_3CH_2OH$
Stunden	$2^1/_2$	$3^1/_2$	19	$20^1/_2$	14	8	Im ganzen	Depression	Alkohol in mg	
I. Portion	48,7	82	290	58,7	95,3	19,7	594,4	0,24	582	100 : 98
II. Portion	13,7	18,7	21	9,3	2,5	1,2	66,4	Spuren	Spuren	—

Das voraussichtliche Defizit in der Ausscheidungsmenge von CO_2 betrug $\alpha = 2225,2 \times 0,2354 = 523,6$ mg. Das tatsächlich beobachtete betrug $594,4 - 66,4 = 528$ mg.

Die völlige Entfärbung der II. Portion war in diesem Versuch nicht eingetreten, trotzdem die Abschwächung der Färbung auf die Nähe des Endes der Reaktion hinwies. Wie die weiteren Versuche zeigten, kompliziert der Zusatz von allzu großen Quantitäten Methylenblau die Reaktion, vielleicht geschieht dies infolge einer Veränderung der physikalischen Bedingungen des Versuches. Es muß gesagt sein, daß die Leukoverbindung im Gegensatz zu dem Methylenblau selbst im Wasser sehr schwach löslich ist[1]) und deshalb in dem Maße, in dem die Reduktion fortschreitet, als weißes Sediment ausfällt. In diesem Versuch

[1]) Bernthsen, a. a. O.

war die Leukoverbindung in sehr großer Menge ausgefallen. Deshalb war vielleicht in diesem Versuch der geringe Unterschied zwischen dem vorausberechneten und tatsächlich beobachteten Defizit bloß eine zufällige Erscheinung. In den anderen Versuchen, in denen große Mengen Methylenblau genommen wurden, wurde solch ein geringer Unterschied nicht beobachtet (s. weiter unten). Uud doch beweist dieser Versuch, daß man mit Hilfe von Methylenblau die Alkoholgärung fast vollständig hemmen kann, auf diese Weise eröffnet sich ein neuer Weg zum Studium der Anfangsstadien der Hexosespaltung. Eine der nächsten Aufgaben ist die Beantwortung der Frage, was unter solchen Bedingungen mit dem Zucker geschieht.

Versuch VI. I. Kontrollportion: 100 ccm Wasser + 8 g derselben Hefe + 25 g Saccharose + 2,5 ccm Toluol. II. Versuchsportion: dasselbe + 1112,6 mg Methylenblau.

CO_2 bis zur Entfärbung ausgeschieden					CO_2 nach der Entfärbung ausgeschieden			Im ganzen	Bestimmung des Alkohols		$CO_2:CH_3$-CH_2OH
Stunden	$2^1/_2$	2	$4^1/_2$	Im ganzen	24	24	24		Depression	Alkohol in mg	
I. Portion	69,7	125,3	270	465	816,4	350,5	172	1803,9	0,70°	1666	100 : 92
II. Portion	25,3	62	111,3	198,6	409	241,3	156,5	1005,4	0,37°	881	100 : 87

In der II. Portion wurde 1112,6 × 0,0054 = 6,008 mg Wasserstoff abgelenkt. Das vorausberechnete Defizit des CO_2 betrug im Vergleich zur Kontrollportion α = 1112,6 × 0,2354 = 261,8. Das tatsächlich beobachtete betrug 465 — 198,6 = 266,4 mg.

Versuch VII. I. Kontrollportion: 100 ccm Wasser + 6 g derselben Hefe + 25 g Saccharose + 2,5 g Toluol. II. Versuchsportion: dasselbe + 410,1 mg Methylenblau.

CO_2 bis zur Entfärbung ausgeschieden				Nach der Entfärbung		Im ganzen	Bestimmung des Alkohols		CO_2 : CH_3CH_2OH
Stunden	3	4	Im ganzen	24	24		Depression	Alkohol in mg	
I. Portion	85,4	150,2	235,6	388,4	162,9	786,9	0,30°	714	100 : 91
II. Portion	48,6	86,5	135,1	211,3	93,4	439,8	0,18°	428	100 : 97

Wasserstoff wurde in der II. Portion abgelenkt: 410,1 × 0,0054 = 2,215 mg. Das vorausgesetzte Defizit war: α = 410,1 × 0,2354 = 96,5 mg. Das tatsächlich vorgefundene Defizit: 235,6 — 135,1 = 100,5 mg.

Versuch VIII. I. Kontrollportion: 65 ccm Wasser + 5 g derselben Hefe + 20 g Saccharose + 2,5 ccm Toluol. II. Versuchsportion: dasselbe + 1112,6 mg Methylenblau.

CO_2 bis zur Entfärbung ausgeschieden					Bestimmung des Alkohols		$CO_2 : CH_3CH_2OH$
Stunden	3	4	14	Im ganzen	Depression	Alkohol in mg	
I. Portion . .	71,5	162,8	383,4	617,7	0,25°	595	100 : 96
II. Portion . .	45,7	99,4	172,4	317,5	0,12°	286	100 : 89

Wasserstoff wurde der II. Portion entzogen: 6,008 mg. Das vorausgesetzte Defizit war: $\alpha = 261{,}8$ mg. Das tatsächlich vorgefundene Defizit: 617,7 — 317,5 = 300 mg.

Versuch IX. I. Kontrollportion: 65 ccm 20prozentige Glykoselösung + 5 g Hefanol + 2,5 ccm Toluol. II. Versuchsportion: dasselbe + 400 g Methylenblau.

CO_2 bis zur Entfärbung ausgeschieden				Bestimmung des Alkohols		$CO_2 : CH_3CH_2OH$
Stunden	6	10	Im ganzen	Depression	Alkohol in mg	
I. Portion . .	128,2	338,3	466,5	0,19°	452	100 : 97
II. Portion . .	88,3	293,1	381,4	0,15°	357	100 : 93

Der zweiten Portion wurden $400 \times 0{,}0054 = 2{,}16$ mg Wasserstoff entzogen. Das vorausberechnete Defizit betrug: $\alpha = 400 \times 0{,}2354 = 94{,}2$, das tatsächlich festgestellte = 85,1 mg.

In allen sechs Portionen, in denen die Bestimmung des Alkohols vorgenommen wurde, zeigte es sich, daß in der Portion mit Methylenblau seine Ausscheidung sich im Vergleich zu der Kontrollportion genau parallel der Ausscheidung des CO_2 verringerte: das Verhältnis des CO_2 zum Alkohol bleibt auch in Gegenwart von Methylenblau der theoretischen Norm nahe; durch Entfernung des Wasserstoffes kann dies Verhältnis nicht verändert werden. Besonders belehrend ist in dieser Beziehung der Versuch V, bei dem in der Kontrollportion 582 mg Alkohol und 594,4 mg CO_2 vorgefunden wurden, indes in der Versuchsportion mit Methylenblau der Gärungsprozeß fast vollständig gehemmt war; sowohl CO_2 als Alkohol wurde nur in sehr geringen Mengen vorgefunden. Auf diese Weise haben es beide Komponenten der Gärung, sowohl das CO_2

als auch der Alkohol, in gleichem Maße notwendig, daß der aktive Wasserstoff, der zeitweise von der Reduktase gebunden war, wieder dem Gärungsprozesse zugewendet wird und die Reduktionsreaktionen ausübt, ohne welche der Gärungsprozeß nicht sein normales Ende erreichen kann, mit anderen Worten, es spielt sich dieser Reduktionsvorgang früher ab, als die Abspaltung beider Produkte der Gärung.

In den Destillaten, die zur Bestimmung des Alkohols dienten, wurden qualitative Proben auf das Vorhandensein von Aldehyden und Ketonen vorgenommen (Reaktion mit Fuchsinschwefelsäure und Natriumnitroprussidlösung). Die Reaktion auf das Vorhandensein von Ketonen gab immer ohne Ausnahme ein negatives Ergebnis. In Anwesenheit von Fuchsinschwefelsäure wurde manchmal eine schwache Färbung beobachtet. In Anbetracht der Empfindlichkeit dieser Reaktion müssen wir zugeben, daß die Entstehung von merklichen Mengen von flüchtigen Aldehyden auch nicht stattfand. Wenn also, wie S. Kostytschew meint, das Azetaldehyd tätsächlich ein Zwischenprodukt des Gärungsprozesses bildet, so geht seine Entstehung komplizierter vor sich, als man nach dem Schema dieses Autors voraussetzen könnte[1]).

Versuch X. Zu diesem Versuch wurde Mazerationssaft genommen, der nach Lebedew gewonnen war. Die Filtration dauerte 12 Stunden bei einer Temperatur von circa 0°.

I. Kontrollportion: 30 ccm Saft + 6 g Glykose + 2 ccm Toluol.
II. Versuchsportion: dasselbe + 1466,4 mg Methylenblau.

	CO_2 ausgeschieden			Im ganzen
Stunden	6	14	8	
I. Portion . . .	251,4	901,4	233,8	1386,6
II. Portion . . .	201,5	665,6	128,1	995,2

Versuch XI. Der Saft wurde 15 Stunden bei einer Temperatur von ungefähr 2—3° filtriert. I. Kontrollportion: 30 ccm Saft + 7 g

[1]) Ich muß übrigens sagen, daß ich, wenn ich von Reduktionsvorgängen spreche, selbstverständlich nur jene im Auge habe, welche dank der konkurrierenden Wirksamkeit des Methylenblaus wegfallen. Man kann annehmen, daß in dem gärenden Medium auch noch andere Reduktionsvorgänge stattfinden, welche das Methylenblau nicht imstande ist zu stören. Dann bleibt das Schema von S. Kostytschew vollständig außer dem Bereich meiner Arbeit.

Glykose + 2 ccm Toluol. II. Versuchsportion: dasselbe + 2191,6 mg Methylenblau.

CO_2 ausgeschieden			Im ganzen
Stunden	13	$8^1/_2$	
I. Portion	353,5	533,3	886,8
II. Portion	211,5	109,2	320,7

In Anbetracht dessen, daß sich auf dem Boden der Kolben ein reichliches Sediment gebildet hatte, welches den Gasstrom erschwerte, wurden beide Versuche (der X. und der XI.) abgebrochen, bevor völlige Entfärbung eingetreten war.

Trotzdem der Reduktionsvorgang nicht zu Ende gekommen war, hatte der tatsächliche Unterschied in der Ausscheidung von CO_2 zwischen den beiden Portionen schon den vorausberechneten Unterschied überstiegen: im Versuche X war $\alpha = 1386,6 - 995,2 = 391,4$; vorausberechnet war $\alpha = 1466,3 \times 0,2354 = 345,2$. Im Versuch XI war $\alpha = 886,8 - 320,7 = 566,1$ mg; gegenüber der voraus berechneten Menge: $\alpha = 2191,6 \times 0,2354 = 515,9$ mg. Es war zu viel Methylenblau genommen worden. Deshalb ging ich bei den folgenden Versuchen zu geringeren Mengen über.

Versuch XII. Der Saft wurde im Laufe von 12 Stunden bei einer Temperatur von circa 0° filtriert. I. Kontrollportion: 30 ccm Saft + 10 ccm Wasser + 8 g Glykose + 2 ccm Toluol. II. Versuchsportion: dasselbe + 565,8 mg Methylenblau.

Ausscheidung des CO_2 bis zur Entfärbung				CO_2 nach der Entfärbung		Im ganzen
Stunden	13	$8^1/_2$	Im ganzen	$16^1/_2$	24	
I. Portion . . .	353,5	433,3	786,8	453,2	230	1470
II. Portion . . .	323,5	302	625,5	474,8	229	1329,3

Aus der II. Portion wurden $565,8 \times 0,0054 = 3,06$ mg Wasserstoff entfernt. Das vorausberechnete Defizit betrug: $565,8 \times 0,2354 = 133,2$ mg. Das tatsächlich vorhandene: $786,8 - 625,5 = 161,3$ mg.

Versuch XIII. Der Saft wurde im Laufe von 4 Stunden bei Zimmertemperatur filtriert. I. Kontrollportion: 50 ccm Saft + 10 g Glykose + 2,5 ccm Toluol. II. Versuchsportion: dasselbe + 323,5 mg Methylenblau.

CO_2 bis zur Entfärbung ausgeschieden				CO_2 nach der Entfärbung	Im ganzen
Stunden	$2^1/_2$	$15^1/_2$	Im ganzen	23	
I. Portion	103	877,2	980,2	803,3	1783,5
II. Portion	88	832	920	780,5	1700,5

Nach $2^1/_2$ Stunden war die Entfärbung noch nicht eingetreten. Am Morgen (nach noch $15^1/_2$ Stunden) war die II. Portion vollständig entfärbt. Aus der II. Portion wurden $= 323{,}5 \times 0{,}0054 = 1{,}75$ mg Wasserstoff entfernt. Das vorausberechnete Defizit war: $\alpha = 323{,}5 \times 0{,}2354 = 76{,}1$ mg, das tatsächlich vorgefundene: $980{,}2 - 920 = 60{,}2$ mg.

Versuch XIV. Der Saft wurde im Laufe von 14 Stunden bei einer Temperatur von circa 0^0 filtriert. Es wurden vier Portionen verwendet: I. Portion: 30 ccm Saft + 6 g Glykose + 2 ccm Toluol. Luftstrom. II. Kontrollportion: dasselbe. Wasserstoffstrom. III. Portion: dasselbe + 463,3 mg Methylenblau. Wasserstoffstrom. IV. Portion: dasselbe + 780,8 mg Methylenblau. Wasserstoffstrom.

Die I. Portion wurde nicht mit dem Apparate von Bardeleben in Verbindung gebracht und wurde verwendet, um zu prüfen, ob der Mazerationssaft die Hexose unter aeroben (I. Portion) und anaeroben (II. Portion) Verhältnissen in gleichem Maße vergärt.

Stunden	I. Portion	II. Kontroll-portion	III. mit Methylenblau	IV. mit Methylenblau
7	330,5	324,8	226,4	201,8
6	212,5	207,2	199,3	165,6
16	312	320,8	354,5	273,2
24	184	172	138,1	74,0
Im ganzen	1039,0	1024,8	918,3	714,6

Die III. Portion entfärbte sich nach 7 Stunden. Es wurde ihr $H_2 = 463{,}3 \times 0{,}0054 = 2{,}5$ mg entzogen. Das vorausberechnete Defizit betrug: $\alpha = 463{,}3 \times 0{,}2354 = 109{,}1$ mg, das tatsächlich vorgefundene: $\alpha = 324{,}8 - 226{,}4 = 98{,}4$ mg. Die IV. Portion entfärbte sich nach $7 + 6 = 13$ Stunden. Es wurde ihr $780{,}8 \times 0{,}0054 = 4{,}22$ mg Wasserstoff entzogen. Das vorausberechnete Defizit betrug: $780{,}8 \times 0{,}2354 = 183{,}8$ mg, das tatsächlich vorgefundene: $(324{,}8 + 207{,}2) - (201{,}8 + 165{,}6) = 164{,}6$ mg.

Der Vergleich der I. und II. Portion beweist, daß die Zymase auch in dem Mazerationssaft sich zu dem Sauerstoff der Luft vollständig inaktiv verhält[1]).

Versuch XV. Der Saft wurde im Laufe einer Nacht bei der Temperatur von circa + 6° filtriert. I. Kontrollportion: 25 ccm Saft + 5 g Glykose + 2 ccm Toluol. II. Portion: dasselbe + 410 mg Methylenblau. III. Portion: dasselbe + 429 mg Methylenblau.

Die Entfärbung trat in der II. und III. Portion fast gleichzeitig ein (nach 20 Stunden) und deshalb wurden alle Portionen parallel abgenommen.

Stunden	I. Kontrollportion	II. mit Methylenblau	III. mit Methylenblau
8	184,1	150,4	145,3
12	309,2	233,8	233,9
	493,3	384,2	379,2
20	358	385,4	361,4
72	171,4	154,8	142,5
Im ganzen	1022,7	924,4	883,1

In der II. Portion wurde Wasserstoff $H_2 = 410 \times 0,0054 = 2,21$ mg abgelenkt. Das vorausberechnete Defizit betrug: $\alpha = 410 \times 0,2354 = 96,5$ mg, das tatsächlich aufgefundene: $\alpha = 493,3 - 384,2 = 109,1$ mg. In der III. Portion wurden $H_2 = 429 \times 0,0054 = 2,32$ mg Wasserstoff abgelenkt. Das vorausberechnete Defizit betrug: $\alpha = 429 \times 0,2354 = 101$ mg, das tatsächlich vorgefundene: $\alpha = 493,3 - 379,2 = 114,1$ mg.

Bemerkenswert ist die Tatsache, daß in den Versuchen mit Hefemazerationssaft, wenn nur nicht zu viel Methylenblau genommen wurde, nach Beendigung der Reduktionsperiode die Portion mit Methylenblau nicht selten im Vergleich zu der Kontrollportion einen gewissen Überschuß an CO_2 gibt. In den früheren Versuchen mit Trockenhefe wurde fast regelmäßig das Gegenteil beobachtet: auch nach Beendigung der Reduktionsperiode blieb die Portion mit Methylenblau hinter der normalen zurück, ihre Arbeit blieb verringert; dies ist wahrscheinlich einer von den Gründen, welche die Benutzung von großen Dosen Methylenblau unbequem machen; wenn die Reduktionsperiode verzögert wird, tritt die Wirkung eines neuen Faktors hinzu und die gegenseitigen Beziehungen werden verschoben.

In den Versuchen mit Hefemazerationssaft, in denen kleine Mengen des Reagens benutzt werden, wird solch ein Unterschied zwischen den

[1]) S. Gromow und Grigoriew, a. a. O.

zwei Portionen nicht beobachtet: so blieb in dem Versuch XIII selbst nach 40 Stunden der Unterschied zwischen den Portionen, der 83 mg betrug, nahe dem vorausberechneten (= 76,1), trotzdem die Reduktion lange schon beendigt war. In anderen Fällen, wiederhole ich, wird sozusagen die Tendenz bemerkbar, das nachzuholen, was in der ersten Periode versäumt wurde.

Wie sich diese eigentümliche „Nachwirkung" erklären läßt, kann ich vorläufig noch nicht beurteilen. Es muß erst festgestellt werden, was in der Reduktionsperiode mit dem Zucker geschieht[1]).

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse aller Versuche, mit Ausnahme derer, in denen allzu große Mengen Methylenblau benutzt wurden, zusammengestellt.

Nummer der Versuche	Methylenblau (wasserhaltiges Salz) in mg	CO_2 in der Kontrollportion	CO_2 in der Versuchsportion	Der beobachtete Unterschied	Der vorausberechnete Unterschied	Abgelenktes H_2 in mg
1.	2.[2])	3.	4.	5.	6.[2])	7.
IV	556,3	734	600,5	133,5	130,9	3,004
VI	1112,6	465	198,6	266,4	261,8	6,008
VII	410,1	235,6	135,1	100,5	96,5	2,215
VIII	1112,6	617,7	317,5	300,2	261,8	6,008
IX	400	466,5	381,4	85,1	94.2	2,16
XII	565,8	786,8	625,5	161,3	133,2	3,06
XIII	323.5	980,2	920,0	60,2	76,1	1,75
XIV	463,3	324,8	226,4	98,4	109.1	2,5
XIV	780,8	532,0	367,4	164,6	183,8	4,22
XV	410	493,3	384,2	109,1	96,5	2,21
XV	429	493,3	379,2	114,1	101,0	2,32

Die Ähnlichkeit der Zahlen in der 5. und 6. Reihe beweist, wie mir scheint, daß die Überlegungen, von denen ich ausgegangen bin, ihrem Wesen nach richtig waren.

Die Grundthese kann auf folgende Weise ausgedrückt werden: ein Grammolekül Methylenblau entzieht dem gärenden Medium ein Grammolekül (d. h. zwei Grammatome) Wasserstoff und inaktiviert

[1]) Die unlängst erschienene Arbeit von H. Euler und Th. Berggren, Über die primäre Umwandlung der Hexosen bei der alkoholischen Gärung (Zeitschr. f. Gärungsphysiologie, Bd. 1, 1912, S. 203) beschäftigt sich mit der sehr wichtigen Frage über das Anfangsstadium der Zuckerspaltung bei der Gärung.

[2]) Siehe Anmerkung auf S. 302.

dadurch **ein** Grammolekül Hexose, welches auf diese Weise vor der weiteren Spaltung in Alkohol und CO_2 bewahrt wird. Aus dieser Grundthese lassen sich, denke ich, folgende Schlüsse ziehen:

1. Das erste oder eins der ersten Stadien der Alkoholgärung ist die Aktivierung zweier Atome Wasserstoff unter Mitwirkung der Reduktase. Über den Ursprung dieses aktiven Wasserstoffes kann ich nichts sagen, ich kann auch nicht sagen, ob er unmittelbar von der Hexose abgespalten wird oder ob er das Ergebnis der Dissoziation des Wassers in Ionen[1]) bildet. (In letzterem Falle wird das Hexosemolekül zum Gegenstand der oxydierenden Einwirkungen seitens der sich parallel bildenden OH-Ionen). Ohne mich bei der Frage aufzuhalten, was mit der Hexose geschieht, stelle ich mir dieses Stadium schematisch folgenderweise vor:

$$C_6H_{12}O_6 + \text{Red.} = (C_6H_{12}C_6 - 2\,H) + \text{Red.}\langle{}^{H}_{H}.$$

2. Der Wasserstoff, der zeitweise von der Reduktase gebunden wird, ist zum normalen Verlauf der Gärung notwendig; dabei bedürfen beide Komponenten, sowohl das CO_2 als auch der Alkohol, in gleichem Maße der Mitwirkung dieses Wasserstoffes in dem weiteren Verlauf des Gärungsprozesses.

3. Die Abwesenheit einer klar ausgeprägten qualitativen Reaktion auf Aldehyde (mit Fuchsinschwefelsäure) zeigt, daß die Bildung von Aldehyden bei der Gärung des Zuckers, wenn sie auch wirklich stattfindet, ein komplizierterer Vorgang ist, als man nach dem Schema von Kostytschew voraussetzen könnte[2]).

4. Zwischen der Reduktions- und Gärungsenergie der Hefe besteht, wie es scheint, ein strenger Parallelismus: indem wir die Reduktase zwingen, den von ihr fixierten Wasserstoff anderweitig abzugeben, verringern wir in streng äquimolekularem Verhältnis die Ausscheidung der Gärungsprodukte.

In allen oben beschriebenen Versuchen arbeitete die Zymase in Gegenwart von Zucker. In meinen Versuchen, die sich auf die Selbstgärung der Hefe bezogen, stieß ich wieder auf scharf ausgeprägte molekulare Verhältnisse, wenn auch in anderer, sehr eigentümlicher Form.

---

[1]) Die Idee von der aktiven Rolle des Wassers im Gärungsprozeß ist in dem von W. Palladin entwickelten Schema durchgeführt (W. Palladin, Zeitschr. f. Gärungsphysiologie, Bd. 1. 1912, S. 91).

[2]) Siehe S. 301.

III. Versuche mit der Selbstgärung der Hefe.

Trockene Hefepräparate, die ohne Zusatz von Zucker mit Wasser vermischt werden, sind imstande, eine ziemlich energische Reduktion des Methylenblaus hervorzurufen, trotzdem die Ausscheidung von CO_2 unter den Bedingungen der Selbstgärung sich dabei nicht immer in großen Zahlen ausdrückt. Der nach Lebedew hergestellte Hefensaft hat eine sehr schwache Fähigkeit zur Selbstgärung. Unter gewissen Bedingungen (langdauernde Filtration) reduziert sich die Selbstgärung (im Sinne der Ausscheidung von CO_2) praktisch auf Null.

Versuch XVI. 50 ccm Saft, die im Laufe von 14 Stunden filtriert wurden, haben im ganzen 14,2 mgr CO_2 (ohne vorhergehende Evakuation) ausgeschieden. Andere 50 ccm desselben Saftes haben unter anaeroben Bedingungen (Wasserstoffatmosphäre) 500 mg Methylenblau vollständig entfärbt. Wenn unter den Bedingungen der Selbstgärung dieselben Verhältnisse bestehen würden, die bei dem Gärungsprozeß in Anwesenheit von Zucker beobachtet werden, so müßten diese 500 mg Methylenblau, indem sie sich zur Leukoverbindung reduzieren, die Ausscheidung der CO_2 auf 118 mg verringern. Aber sie sind nicht vorhanden: die Kontrollportion hat im ganzen 14,2 mg ergeben. Außerdem enthält der Mazerationssaft, wie Lebedew behauptet, gar kein oder fast gar kein Glykogen, d. h. kein Gärmaterial. Dessenungeachtet entzieht das Methylenblau selbst unter diesen Bedingungen noch Wasserstoff. Woher kommt nun der letztere und zu welchen Vorgängen führt seine Entziehung?

Schon die ersten Versuche, deren Methodik eine Nachahmung der früheren Versuche bildete, gaben ein unerwartetes Resultat: das Methylenblau stimuliert die Ausscheidung von CO_2.

Versuch XVII. Zu jeder der zwei Portionen wurden je 6 g Trockenhefe nach Lebedew + 100 ccm Wasser + 2,5 ccm Toluol genommen. Die II. Portion erhielt außerdem 400 mg Methylenblau. Nach 36 Stunden, in deren Verlauf das Methylenblau vollständig entfärbt wurde, ergab die I. Portion — ohne Methylenblau — 108,6 mg CO_2, die II. Portion — mit 400 mg Methylenblau — 157,4 mg CO_2. Der Unterschied zugunsten der II. Portion betrug 48,8 mg.

Versuch XVIII. Es wurden vier Portionen verwendet: I. Kontrollportion: 50 cm Wasser + 5 g derselben Hefe + 2 ccm Toluol. II. Portion: dasselbe + 200,5 mg Methylenblau. III. Portion: dasselbe + 401 mg Methylenblau. IV. Portion: dasselbe + 700 mg Methylenblau.

Die II. Portion entfärbte sich nach 5 Stunden und wurde abgenommen; die III. wurde am Morgen entfärbt gefunden und 20 Stunden nach Beginn des Versuches abgenommen; die IV. 55 Stunden nach Beginn des Versuches. Die Röhren wurden gleichzeitig abgenommen und neue zur Kontrollportion (I) aufgestellt. — Die II., III. und IV. Portion haben im Laufe der entsprechenden Periode der Reduktion des Methylenblaus 54,5; 135,6; 191,1 mg CO_2, im Laufe derselben Periode hat die Kontrollportion 32,4; 80,4; 104,7 mg CO_2 ausgeschieden. Der Unterschied zugunsten der Portionen mit Methylenblau betrug: für die II. Portion mit 200,5 mg Methylenblau 54,5 — 32,4 = 22,1 mg, für die III. Portion mit 401 mg Methylenblau 135,6 — 80,4 = 55,2 mg, für die IV. Portion mit 700 mg Methylenblau 191,1 — 104,7 = 86,4 mg.

Wir sehen, daß zwischen dem Überschuß an CO_2 und der Menge des reduzierten Methylenblaus eine gewisse Proportionalität besteht. Wenn wir in diesen zwei Versuchen eine Umrechnung auf 100 mg Methylenblau machen, so erhalten wir folgende Reihe von Zahlen: Auf 100 mg Methylenblau würde überschüssige CO_2 ausgeschieden: $\frac{48,8}{4} = 12,2$ $\frac{22,1}{2} = 11,0$ $\frac{55,2}{4} = 13,8$ $\frac{86,4}{7} = 12,3$. Die Zahlen schwanken ziemlich nahe zwischen 11 und 14. Diese Zahlen erhalten eine sehr bestimmte Bedeutung, wenn wir voraussetzen, daß die Entziehung zweier Wasserstoffatome (die sich mit Hilfe eines Moleküls Methylenblau vollzieht) unter den Bedingungen der Selbstgärung die Bildung nur eines überschüssigen CO_2-Moleküls hervorruft. In diesem Falle muß auf Grund der molekularen gegenseitigen Beziehungen folgende Proportion Platz haben: $373,8 : 44 = 100 : \alpha$; $\alpha = 11,77$, d. h. je 100 mg Methylenblau müssen die Ausscheidung von zirka 12 mg (11,77 mg) überschüssiger CO_2 hervorrufen.

Versuch XIX. Es wurden 4 Portionen verwendet: I. Kontrollportion: 100 ccm Wasser + 10 g Hefanol + 2,5 ccm Toluol, II. Portion: dasselbe + 158,5 mg Methylenblau, III. Portion: dasselbe + 293,7 mg Methylenblau, IV. Portion: dasselbe + 606,0 mg Methylenblau.

Infolge eines Zufalles konnte ich den Verlauf des Versuches nicht verfolgen, und alle Portionen wurden gleichzeitig, 26 Stunden nach Beginn des Versuches, als die Reduktion des Methylenblaus schon in allen drei Portionen völlig beendigt war, abgenommen. Im Laufe dieser Zeit wurde an CO_2 ausgeschieden: in der I. Portion 207,4 mg; in der II. 193,3 mg; in der III. 210,3 mg; in der IV. 246,0 mg. Die I. Portion (ohne Methylenblau) hat im Gegensatz zu den früheren Versuchen etwas

mehr CO_2 ausgeschieden als die II. Portion mit der geringsten Menge Farbstoff. Ob dieser Unterschied eine Folge eines zufälligen Fehlers in der Analyse oder eine natürliche Erscheinung war, kann ich nicht mit Bestimmtheit sagen. Wenn wir aber den Unterschied zwischen der III. und II. Portion und sodann den Unterschied zwischen der IV. und III. berechnen, so erhalten wir folgende Proportionen: III erhielt 135,2 mg Methylenblau mehr als II und hat 210,3 — 191,3 = 17 mg CO_2 mehr ausgeschieden als II. Auf 100 mg Methylenblau kommen $\frac{17}{1,352} = 12,5$ mg CO_2. IV erhielt 312,3 mg Methylenblau mehr als III und hat 246 — 210,3 = 35,7 mg mehr CO_2 ausgeschieden. Auf 100 mg Meth. kommen $\frac{35,7}{3,123} = 11,4$ mg überschüssige CO_2.

Wieder eine bedeutende Annäherung an die theoretisch berechnete Zahl (11,77)! Und doch war ich nicht vollständig überzeugt, bevor ich nicht zu den Versuchen mit Mazerationssaft überging.

Versuch XX. Der Saft wurde im Laufe einer Stunde filtriert. I. Kontrollportion: 10 ccm Saft + 10 ccm Wasser + 1 ccm Toluol. II. Portion: dasselbe + 100 mg Methylenblau. III. Portion: dasselbe + 200 mg Methylenblau.

Nach 24 Stunden wurde der Versuch unterbrochen. Die II. Portion war vollständig entfärbt (während der Nacht), die III. hatte sich nicht entfärbt. Die Portionen hatten 5,7; 17,8; 20,1 mg CO_2 ausgeschieden. Auf 100 mg Methylenblau kamen in der II. Portion 17,8 — 5,7 = 12,1 mg (gegen 11,77) überschüssige CO_2.

Versuch XXI. Der Saft wurde im Laufe von 2 Stunden filtriert. I. Kontrollportion: 10 ccm Saft + 1 ccm Toluol. II. Portion: dasselbe + 100 mg Methylenblau. III. Portion: dasselbe + 200 mg Methylenblau. IV. ebenso wie I., aber im Luftstrom.

Der Apparat war zwei Tage im Gang (überhaupt ist es bei den Versuchen mit Hefensaft unter den Bedingungen der Selbstgärung nicht nötig, den Augenblick der Entfärbung zu verfolgen). Die I. und IV. Portion hatten eine ganz gleiche Quantität CO_2 = 6,7 mg ausgeschieden. Die II. Portion ergab 18,6 mg CO_2. Auf 100 mg Methylenblau kamen 18,6 — 6,7 = 11,9 mg (gegen 11,77) überschüssige CO_2. III hatte sich nicht entfärbt und ergab 25,8 mg CO_2. Es ist bezeichnend, daß in der III. Portion des Versuchs XX und der III. Portion des Versuchs XXI, wo die Reduktion ihr Ende nicht erreicht hatte, die Quantität des über-

schüssigen CO_2 auch nicht die theoretische Größe erreichte: zwischen beiden Vorgängen besteht ein strenger Parallelismus.

Versuch XXII. Der Saft wurde im Laufe von 16 Stunden bei einer Temperatur von zirka $+ 5^0$ filtriert. I. Kontrollportion: 50 ccm Saft + 2,5 ccm Toluol. II. Portion: dasselbe + 218 mg Methylenblau. III. Portion: dasselbe + 450 mg Methylenblau. IV. Portion: dasselbe + 634 mg Methylenblau.

Der Apparat war drei Tage im Gang. Das Methylenblau hatte sich in allen drei Portionen entfärbt. Alle Portionen wurden gleichzeitig abgenommen und ergaben CO_2: Die I. Portion 14 mg, die II. Portion 39,1 mg. Überschuß gegenüber der Kontrollportion 39,1 — 14 = 25,1 mg. Auf 100 mg Methylenblau kommen $\frac{25,1}{2,18}$ = 11,5 mg überschüssige CO_2. Die III. Portion 68,5 mg. Überschuß 68,5 — 14 = 54,5 mg. Auf 100 mg Methylenblau kommen $\frac{54,5}{4,5}$ = 12,1 mg überschüssiges CO_2. Die IV. Portion 90,1 mg. Überschuß gegen die Kontrollportion = 90,1 — 14 = 76,1 mg. Auf 100 mg Methylenblau kommen $\frac{76,1}{6,34}$ = 12,0 mg überschüssige CO_2.

Es bleibt kein Zweifel an der Richtigkeit der oben ausgedrückten These. Analog der früheren, stelle ich sie wie folgt auf: ein Grammmolekül Methylenblau ruft, indem es aus dem gärenden Medium unter den Bedingungen der Selbstgärung ein Grammmolekül (das sind zwei Grammatome) Wasserstoff entzieht, die Ausscheidung eines Grammoleküls CO_2 hervor.

Um mich von dem fermentativen Charakter dieses Vorganges zu überzeugen, habe ich folgenden Versuch angestellt:

Versuch XXIII. Der Saft wurde im Laufe einer Nacht bei einer Temperatur von ca. 8—10^0 filtriert. I. Portion: 15 ccm Saft + 15 ccm Wasser + 2 ccm Toluol. II. Portion: dasselbe + 100 mg Methylenblau. III. Portion: 15 ccm Saft + 15 ccm Wasser wurden im Laufe von 10 Minuten bei einer Temperatur von 80^0 erwärmt, nach der Abkühlung wurden 100 mg Methylenblau hinzugesetzt und die Portion, gleichzeitig mit den zwei ersten, mit dem Apparate in Verbindung gesetzt.

Die I. Portion hat 5,3 mg CO_2 ausgeschieden. Die II. Portion hat sich entfärbt und 17,4 mg CO_2 ausgeschieden, d. h. auf 100 mg Methylenblau kam ein Überschuß von 17,4 — 5,3 = 12,1 mg. Die III. Portion hat sich nicht entfärbt und kein CO_2 ausgeschieden.

Es ist klar, daß der Vorgang einen fermentativen Charakter hat. Es blieb noch ein Zweifel unbeseitigt. Methylenblau ist ein Salz. Vielleicht erleidet die Leukoverbindung, die sich unter dem Einfluß der Reduktase bildet, eine Hydrolyse, und das sich dabei befreiende HCl verdrängt die äquivalente Menge von CO_2 aus den Karbonaten? Die Anwesenheit der letzteren im Safte, der ausgeprägten Säurecharakter trägt, ist höchst zweifelhaft, dessenungeachtet habe ich zur Beseitigung dieses Zweifels folgenden Versuch durchgeführt:

Versuch XXIV. Der Saft wurde im Laufe einer Nacht bei einer Temperatur von ca. 10^0 filtriert. I. Kontrollportion: 50 ccm Saft + 2,5 ccm Toluol. II. Portion: dasselbe + 602,5 mg Methylenblau. III. Portion: dasselbe + 102 mg Methylenblau. Der Versuch dauerte drei Tage. Die III. Portion befand sich zum Unterschiede von den beiden ersten die ganze Zeit im Luftstrom. Mit anderen Worten verfällt die sich hier im Laufe der Reduktion bildende Leukoverbindung dem Einfluß des Sauerstoffes, der sie mit geringerer oder größerer Leichtigkeit wieder oxydiert, indem er den Wasserstoff bis zum Wasser verbrennt. Das wiederhergestellte Methylenblau tritt wieder in Tätigkeit, entzieht eine neue Portion aktiven Wasserstoffes usw. Wenn die überschüssige Ausscheidung von CO_2 sich durch die Wirkung des Chlorwasserstoffes erklärt, welches im Prozesse der Hydrolyse frei wird, so muß die wiederholte Entziehung neuer Portionen Wasserstoffes durch dieselbe Menge Methylenblau keine weitere Vermehrung des CO_2 über die Norm hervorrufen, die der abgewogenen Quantität Methylenblau entspricht. Wenn der Hauptgrund in der Entfernung des Wasserstoffes liegt, so muß diese Portion viel energischer arbeiten, als es auf Grund des oben festgestellten Molekularverhältnisses statthaben sollte.

Und die I. Portion (ohne Methylenblau) hat tatsächlich 13,7 mg CO_2, die II. Portion 85 mg CO_2 ausgeschieden. Auf 100 mg Methylenblau kamen überschüssige $CO_2 = \frac{85 - 13,7}{6,025} = 11,8$. Die III. Portion hat 90 mg CO_2 ausgeschieden, mehr, als sogar die II. Portion, obgleich hier sechsmal weniger Methylenblau genommen worden war. Dieser Fall[1]) ist unter anderem auch deshalb interessant, weil er in formeller Hinsicht vollständig von dem von Ostwald aufgestellten Begriff der Katalyse gedeckt wird: eine geringe Menge Methylenblau beschleunigt die Aus-

[1]) Ich kann nicht umhin, darauf hinzuweisen, daß dieser Fall in dem seinerzeit von W. Palladin (W. Palladin, Zeitschr. f. Gärungsphysiologie. Bd. 1, 1912, S. 91) vorgeschlagenen Schema des Atmungsprozesses sozusagen theoretisch vorausgesagt war.

scheidung von CO_2 und befindet sich, ohne in die Endprodukte der Reaktion überzugehen, nach Beendigung der letzteren in seinem ursprünglichen Zustande — in der Form eines Pigmentes. Wenn der Chemismus der Wirkung des Methylenblaus uns nicht bekannt wäre, könnten wir von einer geheimnisvollen Wirkung durch die Berührung sprechen.

Auf Grund aller dieser Versuche müssen wir sagen, daß in dem gärenden Medium Substanzen vorhanden sind, die, wenn es gleichzeitig gelingt, mit Hilfe von Methylenblau zwei Atome Wasserstoff abzulenken, imstande sind, ein Molekül CO_2 abzuspalten. Das ist ein fermentativer Vorgang und er findet, wie es scheint, nur unter den spezifischen Bedingungen der Selbstgärung statt. In Anwesenheit von Zucker wird der entgegengesetzte Vorgang beobachtet: die Entziehung zweier Atome Wasserstoffes verringert die Ausscheidung von CO_2 um zwei Moleküle. Wenn beide Vorgänge gleichzeitig verlaufen würden, so könnte sich summa summarum nicht die Regelmäßigkeit äußern, die mit genügender Klarheit aus den Zahlenangaben der ersten Versuchsserie zutage tritt. Auf diese Weise ruft das Methylenblau unter den Bedingungen der Selbstgärung einen Prozeß sui generis hervor, der in Anwesenheit von Zucker gar nicht oder fast gar nicht stattfindet. Augenscheinlich müssen wir gerade in den spezifischen Bedingungen der Selbstgärung die Erklärung der Erscheinung suchen, die den Gegenstand meines Studiums in den letzten Versuchen bildete. Worin bestehen nun die spezifischen Eigentümlichkeiten der Selbstgärung? Wir wissen, daß unter diesen Bedingungen ein sehr energischer Abbau von Eiweiß vor sich geht, während das Eiweiß in Gegenwart von Zucker fast unberührt bleibt. So wurden, nach den Angaben von Grigoriew und Gromow[1]), ohne Zucker 49,8 % des Eiweißes abgebaut, in Gegenwart von Zucker (35 prozentige Lösung) nur 6,8 %.

Nach den Versuchen von Leonid Iwanoff mit Preßhefe geht der Abbau von Eiweiß in Anwesenheit von Zucker wenigstens zweimal schwächer vor sich als ohne Zucker[2]).

Es erscheint mir deshalb sehr wahrscheinlich, daß bei Anwesenheit von Methylenblau die Produkte des Eiweißabbaues, wohl am richtigsten Amidosäuren, vergärt wurden.

---

[1]) Gromow und Grigoriew, a. a. O.

[2]) Leonid Iwanoff, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 42, 1904, S. 464; desgleichen: Über die Umwandlung des Phosphors in den Gewächsen im Zusammenhang mit den Umwandlungen des Eiweißes, St. Petersburg, 1905 (russisch).

Sehr wertvoll erscheint für mich der Hinweis von A. Bach[1]), der die Aufmerksamkeit der Biologen auf eine interessante Reaktion gelenkt hat, die schon seit langem von Strecker studiert war. Laut dieser Reaktion gehen die Amidosäuren in Gegenwart von Alloxan, welches zwei Atome Wasserstoff an sich nimmt, unter Abspaltung von NH_3 und CO_2 in Aldehyde über. Auch hier, wie in meinen Versuchen, ruft die Entfernung zweier Atome Wasserstoff die Bildung eines CO_2-Moleküls hervor. Wenn der fermentative Vorgang in meinen Versuchen nach dem Typus dieser rein chemischen Reaktion verlaufen würde, so müßte dabei keine Alkoholbildung stattfinden, an Stelle des letzteren müßten sich Aldehyde ansammeln. Untersuchungen in dieser Richtung sind gerade eben eingeleitet worden und die ersten Versuche haben gezeigt, daß Alkohol dabei, wie es scheint, tatsächlich nicht gebildet wird. So wurde in dem vorhergehenden Versuch der Alkohol in der I. und II. Portion bestimmt. In Anbetracht der geringen Menge des Alkohols benutzte ich die Methode von Nicloux. Die zwei letzten Destillate wurden auf den Umfang von je 100 g gebracht.

Die I. Kontrollportion: 5 ccm benötigten 1,2 ccm Bichromatlösung. Folglich betrug der Alkoholgehalt im Destillat 0,12 Vol.-Proz., was dem Gewicht nach 0,096 % entspricht. Es wurden 96 mg Alkohol vorgefunden.

II. Portion mit Methylenblau: 5 ccm benötigten 1,35 ccm Bichromatlösung. Folglich betrug der Alkoholgehalt im Destillat 0,135 Vol.-Proz., was einem Gewicht von 0,107 % entspricht. Es wurden 107 mg Alkohol vorgefunden. Auf diese Weise macht der Unterschied zugunsten der II. Portion im ganzen 107 — 96 = 11 mg aus, indessen wurde hier um 71,3 mg mehr CO_2 als in der I. Portion ausgeschieden.

Versuch XXV. Wiederholung des vorhergehenden Versuches. I. Kontrollportion: 50 ccm Saft + 2 ccm Toluol. II. Portion: dasselbe + 752 mg Methylenblau. III. Portion: dasselbe + 46 mg Methylenblau. Luftstrom.

Bemerkenswert ist der Umstand, daß die III. Portion trotz des Luftstroms sich schnell entfärbte und erst nach zwei Tagen wieder eine intensiv blaue Färbung annahm. Augenscheinlich geht die Reduktion energischer vor sich, als die Oxydation der Leukoverbindung. Die II. Portion war zu Ende des Versuches nicht vollständig entfärbt, sondern hatte einen grünlichen Ton angenommen, der von dem Herannahen des Endes der Reduktion zeugte.

---

[1]) A. Bach, a. a. O.

CO_2 ausgeschieden in Stunden							Im ganzen	Nach der Destillation in g	Bichromat in ccm	Alkohol in % nach Gewicht	Alkohol in mg
Stunden	4	24	24	48	24	24					
I. Portion	7,3	8,3	—	—	—	3,8	19,4	105 g	1,45	0,115 %	121
II. Portion	37,7	33	20,8	—	—	13,3	104,8	170 g	1,0	0,08 %	136
III. Portion	11,7	9,3	17	35	10	2,1	85,1	97 g	1,5	0,12 %	116

Der Unterschied in der Menge des Alkohols zwischen der Versuchs- und Kontrollportion ist im Vergleich zum Unterschiede in der Ausscheidung von CO_2 gering; d. h. man könnte denken, daß tatsächlich die Bildung des überschüssigen CO_2 nicht von einer parallelen Bildung des Alkohols begleitet wird. Aber die absoluten Zahlen sind so gering, daß ich nicht mit Bestimmtheit auf dem endgültigen Schlusse bestehen kann; es sind noch weitere Versuche nach dieser Richtung hin erforderlich. Auf diese Weise führen uns die Versuche über die Selbstgärung der Hefe zu folgenden Schlüssen:

1. Ein Grammolekül Methylenblau ruft, indem es im Reduktionsprozeß (unter den Bedingungen der Selbstgärung) zwei Grammatome Wasserstoff entzieht, die Bildung eines Überschusses an CO_2 in einer Menge von einem Grammolekül hervor, — mit anderen Worten:

2. in dem gärenden Medium befindet sich eine Substanz, die in Abwesenheit von Zucker imstande ist, ein Molekül CO_2 unter der Bedingung abzuspalten, daß aus dieser Substanz gleichzeitig zwei Atome Wasserstoff entfernt werden;

3. dieses ist ein enzymatischer Vorgang: wenn die Fermente des Gärmediums durch Erwärmung zerstört werden, bleibt er stillstehen.

4. Die Ausscheidung eines Überschusses an CO_2 ist wahrscheinlich ein einseitiger Vorgang in dem Sinne, daß dabei kein entsprechender Überschuß in der Ausscheidung von Alkohol beobachtet wird (diese These muß in Anbetracht der geringen Größe der absoluten Zahlen durch neue Versuche bestätigt werden).

5. Ich setze voraus, daß dieses CO_2 ein Ergebnis der Vergärung von Amidosäuren unter paralleler Bildung von Aldehyden ist. Zur Bestätigung dieser Voraussetzung habe ich spezielle Versuche angefangen.

Wie verschieden nach ihren Ergebnissen die unter den Bedingungen der Gärung und Selbstgärung vor sich gehenden Fermentationsvorgänge auch sind: sowohl hier als dort wird ein enger Zusammenhang zwischen diesen Prozessen und der Wirksamkeit der Reduktase beobachtet. Auf

Grund des experimentellen Materials, das in dieser Arbeit zusammengefaßt ist, kann man mit Bestimmtheit sagen, daß die Reduktase in den Gärungsvorgängen die wichtigste Rolle spielt: die Aktivierung des Wasserstoffes, die unter der Einwirkung der Reduktase vor sich geht, bildet die wichtigste Eigentümlichkeit dieser Vorgänge.

Ich glaube, man kann noch weitergehen und sagen, daß die Reduktase den Mittelpunkt des Gärungsapparates bildet, sein hauptsächlichstes enzymatisches Agens ist. Es gibt keine Gärung ohne Reduktase. Daraus kann natürlich nicht die entgegengesetzte Folgerung gezogen werden; wir kennen Reduktasen, die gar keine Beziehung zu der Gärung haben (z. B. das Schardingerenzym). Mit anderen Worten ist die Zymasewirkung (darunter verstehen wir den Gärungsapparat im ganzen) ein spezieller, komplizierter Fall der Reduktasewirkung. Damit sich der Gärungsapparat bilden kann, der seiner Organisation nach sehr kompliziert ist, muß die Reduktase mit neuen Faktoren in Verbindung treten, wobei sie aber doch auch unter ihnen ihre vorherrschende Rolle und Grundfunktion bewahrt. Diese Funktion besteht bei ihr, ebenso wie bei ihrem chemischen Analogon, dem Palladium, in der Aktivierung des Wasserstoffes.

Nitritassimilation durch Schimmelpilze.

2. Mitteilung.

Von **Alexander Kossowicz.**

In meiner ersten Mitteilung[1]) habe ich nachgewiesen, daß alle von mir untersuchten Schimmelpilze in Nitritnährlösungen (bei entsprechender Zusammensetzung der Nährlösung, Temperatur und Versuchsdauer) sich entwickeln können und Nitrit assimilieren. Es wurde betont, daß auch die Annahme einer direkten Assimilation des Nitrit-Ions durch Schimmelpilze, ohne vorhergehende Ammoniakbildung, ihre Berechtigung hat, und daß der bloße qualitative Nachweis von Ammoniak in zuckerhaltigen Nährlösungen mit dem Neßlerschen Reagens nicht dagegen spricht und auch nicht als Gegenbeweis angeführt werden darf, da das Neßlersche Reagens auch mit einer Dextroselösung und natürlich auch mit Invertzucker, bezw. den Spaltprodukten der Hydrolyse des Rohrzuckers in ähnlicher Weise wie mit Ammoniak reagiert, also gelblich- bis rötlichbraune Verfärbungen bezw. Fällungen gibt.

Es galt nun, die bisherigen Untersuchungen durch Prüfung der Schimmelpilzzuchten zu verschiedenen Zeiten, nach verschieden langer Versuchsdauer, in verschiedenen Entwicklungsstadien und durch Heranziehung der maßanalytischen Bestimmung des Ammoniaks mit $^{n}/_{100}$ HCl-Lösung, in den mit dem Neßlerschen Reagens erhaltenen positiven Befunden, zu ergänzen. Zu diesem Zwecke wurden je 10 ccm der zu prüfenden Nährlösung mit gebrannter Magnesia destilliert, das Destillat in einer $^{n}/_{100}$ HCl-Lösung aufgefangen und mit $^{n}/_{100}$ NaOH zurücktitriert. 1 ccm der $^{n}/_{100}$ HCl-Lösung entsprach: 0,0007425 g HCl = 0,0003467 g NH_3. Zur Untersuchung kamen die nachfolgenden 9 Schimmelpilze: Asp. glaucus, Asp. niger, Pen. glaucum, Pen. brevicaule, Mucor Boidin, Isaria farinosa, Botrytis Bassiana, Cladosporium her-

---

1) Al. Kossowicz, Zeitschrift für Gärungsphysiologie, Bd. 2, 1912, S. 55.

barum und ein roten Farbstoff entwickelndes Fusarium (Fusisporium G.). Verwendet wurden in Erlenmeyer-Kölbchen befindliche sterile Nährlösungen (je 50 ccm). Die Probeentnahme geschah unter sorgfältiger Vermeidung einer Luft- oder sonstigen Infektion. Die Pilze wurden zunächst aus Kartoffelzuchten (Kartoffelkeile in Eprouvetten) in eine Nitratzuckerlösung[1]) und nach guter Entwicklung in die Versuchsnährlösungen übertragen.

I. Versuch. Die Nährlösung hatte die Zusammensetzung: 1000 ccm destilliertes Wasser, 5 g KNO_2, 10 g Mannit, 0,3 g KH_2PO_4, 0,3 g $MgSO_4$ und eine geringe Menge $CaCO_3$. Zwei Tage nach Impfung der Nährlösungen konnte in sämtlichen Erlenmeyerkölbchen bei Zimmertemperatur (14—19 ^{0} C) eine schwache Entwicklung der oben genannten Schimmelpilze festgestellt werden. Am 4. Tage war die Entwicklung weiter fortgeschritten und zeigten die Nährlösungen schwache, vielfach durch leere Stellen unterbrochene Hautbildung. Die Untersuchung mit dem Neßlerschen Reagens gab bei allen Schimmelpilzen und bei den Kontrollkölbchen, die ungeimpft geblieben waren, ein negatives Resultat. Ganz ebenso verhielten sich sämtliche Kultur- und Kontrollkölbchen am 6., 7., 9., 10. und 12. Versuchstage. 12 Tage nach Einimpfung der Schimmelpilze in die Nährlösungen zeigten die einzelnen Schimmelpilze in ihrer Entwicklung merkliche Unterschiede. Gute Entwicklung und kräftige Deckenbildung konnte man bei Penicillium glaucum Link, Aspergillus glaucus, Cladosporium herbarum, Botrytis Bassiana und Fusarium (Fusisporium) bemerken; die anderen Pilze waren nur schwach entwickelt, Mucor Boidin wuchs untergetaucht ohne Sporangienbildung. Auch die mit Neßlerschem Reagens ausgeführte Untersuchung der Nährlösungen und des Pilzmyzels am 15., 18., 21., 23. und 24. Versuchstage ergab ein negatives Resultat. Unterdessen hatten sich auch die früher in der Entwicklung zurückgebliebenen Pilze weit besser entwickelt. Nach 26tägiger Versuchsdauer zeigte nun Penicillium glaucum eine deutliche Reaktion mit dem Neßlerschen Reagens, während eine solche bei allen anderen Pilzen und mit den Kontrollösungen nicht erhalten wurde. Die Nährlösungen (je 10 ccm) der sehr kräftig entwickelten Schimmelpilze: Pen. glaucum, Fusarium, Cladosporium, Botrytis und eine sterile Kontrollösung wurden mit MgO destilliert und das Destillat in $^n/_{100}$ HCl aufgefangen. Für

---

[1]) Die betreffende Nitratzuckerlösung, die weiter als Stammzucht für die übrigen Versuche gedient hat, hatte die Zusammensetzung: 1000 ccm destilliertes Wasser, 3 g KNO_3, 20 g Saccharose, 1 g KH_2PO_4, 1 g $MgSO_4$ und eine Spur $CaCO_3$.

Penicillium glaucum wurden 2,29 ccm n/100 HCl verbraucht, während für die übrigen Pilze und die Kontrollnährlösung ein Säureverbrauch von nur je 0,03 ccm eintrat, das Resultat also eigentlich Null war, da die Menge von 0,03 ccm schon innerhalb der Fehlergrenze liegt. Von den untersuchten Pilzen hatte bis zum 26. Versuchstage nur ein Pilz, nämlich Penicillium glaucum, in der Nitrit-Mannit-Nährlösung Ammoniak gebildet[1]). Die zurückgebliebenen Zuchten wurden weiter jeden zweiten Tag mit Neßlerschem Reagens untersucht. Das Resultat war stets ein negatives.

11 Tage später, also 37 Tage nach Beginn des Versuches, zeigten Isaria farinosa und Aspergillus glaucus bereits eine sehr gute Entwicklung, kräftige Deckenbildung und Fruktifikation, während Mucor Boidin, Aspergillus niger und Penicillium brevicaule schwächer entwickelt waren. An diesem Tage wurde nun mit dem Neßlerschen Reagens bei Isaria farinosa eine kräftige NH_3-Reaktion erhalten, während die übrigen Pilzzuchten, darunter auch der sehr kräftig entwickelte, fruktifizierende (Konidien) Asp. glaucus, und die Kontrollelösungen eine solche nicht gaben. Die Destillation mit MgO und die Titration des Destillates zeigten nun bloß bei Isaria farinosa einen Säureverbrauch von 3,1 ccm, bei allen anderen Schimmelpilzen und den Kontrollnährlösungen von je 0,03—0,04 ccm. Es hatte also nur Isaria farinosa Ammoniak gebildet. Vor der Destillation war auch auf das Vorhandensein von Nitrit geprüft worden, das stets auch in den gut entwickelten Pilzzuchten noch nachgewiesen werden konnte.

Von den 9 untersuchten Pilzen hatten während einer 37tägigen Versuchsdauer bei wiederholter Kontrolle nur zwei Schimmelpilze, Penicillium glaucum und Isaria farinosa, Ammoniakbildung gezeigt, und auch bei diesen zwei Pilzen trat sie erst nach längerer Versuchsdauer und erlangter kräftiger Entwicklung, bezw. Fruktifikation ein. Auch die mikrochemische Untersuchung des Pilzmyzels ergab das gleiche Resultat. Es kann daraus jedenfalls geschlossen werden, daß Schimmelpilze ungeachtet ihrer sehr kräftigen Reduktionsfähigkeit, die sich auch gegenüber Nitriten äußern kann, Nitrite auch direkt, ohne vorhergehende Ammoniakbildung assimilieren.

2. Versuch. Die Nährlösung hatte die Zusammensetzung: 1000 ccm destilliertes Wasser, 10 g KNO_2, 2,5 g Dextrose, 2,5 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$ und eine Spur $CaCO_3$. Schon am 2. Tage nach der Impfung

[1]) Daß es sich hierbei tatsächlich um Ammoniak gehandelt hat, wurde in einem Parallelversuch mit Platinchlorid nachgewiesen, doch mußte wegen des sehr geringen Niederschlages von einer gewichtsanalytischen Bestimmung abgesehen werden.

der Nährlösungen mit den eingangs genannten 9 Pilzen war Entwicklung wahrzunehmen. Die Prüfung mit dem Neßlerschen Reagens ergab, wie vorauszusehen war, sowohl in den geimpften Kulturkölbchen als auch in den sterilen Kontrollekölbchen die für NH_3 charakteristische Reaktion. Dies war ja nicht weiter verwunderlich, da ja, wie schon mehrfach erwähnt, Dextrose für sich allein auch diese Reaktion gibt. 13 Tage nach Beginn des Versuches zeigten sehr kräftige Deckenbildung und Fruktifikation: Aspergillus glaucus, Cladosporium herbarum, Fusarium und Botrytis Bassiana; recht gut entwickelt waren: Mucor Boidin = Amylomyces γ (submers, ohne Sporangienbildung) und Penicillium brevicaule; schwach entwickelt: Penicillium glaucum, Isaria farinosa und Aspergillus niger (am schwächsten entwickelt). Alle Pilzkulturen (je 10 ccm der Nährlösung mit vereinzelten Myzelfäden) und die sterilen Kontrollkölbchen wurden an diesem bezw. dem folgenden (14. Versuchstage) mit MgO destilliert und das Destillat in $^n/_{100}$ HCl-Lösung aufgefangen. Penicillium glaucum (obschon ziemlich schwach entwickelt) zeigte einen Säureverbrauch von 2,14 ccm, Fusarium von 1,82 ccm, Botrytis Bassiana von 2,5 ccm, Aspergillus niger (sehr schwach entwickelt) von 0,08 ccm, während die anderen Pilze (darunter weit kräftiger entwickelte, als die eben genannten) und die Kontrollkölbchen nur 0,03—0,04 ccm $^n/_{100}$ HCl verbrauchten[1]). In allen Kölbchen war noch Nitrit vorhanden. Es hatten also in diesem Versuche Penicillium glaucum, Fusarium und Botrytis Bassiana deutliche Ammoniakbildung gezeigt. Zweifelhaft bleibt sie bei dem schwach entwickelten Aspergillus niger.

Nach den bisher mitgeteilten (s. auch d. 1. Mitt.) Untersuchungen kann eine Reduktion von Nitrit zu Ammoniak durch die nachfolgenden Pilze mit Sicherheit erfolgen: Penicillium glaucum, Isaria farinosa, Fusarium (Fusisporium) und Botrytis Bassiana. Nur mit Neßlerschem Reagens wurde sie (in Mannitlösung!) für Phytophthora infestans[2]) nachgewiesen. Bei Aspergillus niger, der sich in Nitrit-

---

[1]) Eine Bestimmung des Pilzgewichtes wurde mit Absicht unterlassen, weil sie nur für manche vergleichende Ernährungsversuche allenfalls einen Wert hat, der übrigens auch noch wegen der großen Fehlergrenze (Größe der Einsaat, Temperaturansprüche, Wasser- und Salzgehalt des Myzels!), die dieser Methode anhaftet, in Zweifel zu ziehen wäre. Die Bezeichnungen „gute Entwicklung und Deckenbildung", „schwache Entwicklung", „Flockenbildung", „keine Entwicklung" sind ungefähr ebenso genau wie die üblichen Pilzgewichtsangaben, die ja doch nur bei großen Gewichtsunterschieden verläßliche Anhaltspunkte geben, bei denen wieder eine besondere Gewichtsbestimmung ziemlich überflüssig erscheint.

[2]) Dieser Pilz ging zugrunde und konnte daher zu den späteren Versuchen nicht mehr herangezogen werden.

nährlösungen bei Zimmertemperatur nur sehr langsam entwickelt, erscheint eine NH_3-Bildung aus Nitrit wahrscheinlich[1]).

Bei den Pilzen: Aspergillus glaucus, Cladosporium herbarum, Penicillium brevicaule und Mucor Boidin (der in Nitritnährlösungen meist submers, ohne Sporangienbildung wächst) wurde bisher eine Ammoniakbildung in Nitritnährlösungen nicht beobachtet.

Weitere Mitteilungen werden folgen. Eine Ergänzung zu diesen Befunden bilden die demnächst zur Veröffentlichung gelangenden, von mir und W. Loew ausgeführten quantitativen Untersuchungen über die Nitrat-Assimilation durch Hefen und Schimmelpilze.

Zusammenfassung: Aus den bisher mitgeteilten Versuchen lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

1. Alle von mir untersuchten Schimmelpilze zeigen in Nährlösungen, die Nitrit als alleinige Stickstoffquelle enthalten (manche erst nach längerer Versuchsdauer), gute Entwicklung; sie vermögen Nitrit zu assimilieren.

2. Manche von den untersuchten Schimmelpilzen bilden, aber erst nach längerer Versuchsdauer und inzwischen eingetretener kräftiger Entwicklung, in Nitritnährlösungen Ammoniak. Zu Beginn der Pilzentwicklung läßt sich eine solche Ammoniakbildung (am deutlichsten zeigt sich dies in Nährlösungen mit Mannit als Kohlenstoffquelle) nicht beobachten.

3. Andere gut entwickelte Pilze zeigen auch nach längerer Versuchsdauer (4—6 Wochen) keine Ammoniakbildung in Nitritnährlösungen. Es ist aber nicht ausgeschlossen, daß in alten Zuchten (die Fehlerquellen sind in solchem Falle zu beachten) oder bei anderer Versuchsanstellung (besonders günstig zusammengesetzte Spezialnährlösungen für den betreffenden Pilz und Optimaltemperatur) sich auch bei diesen Pilzen Ammoniakbildung wird nachweisen lassen. Bei den betreffenden Pilzen konnte bisher auch mikrochemisch, im Myzel, kein NH_3 nachgewiesen werden.

4. Aus Punkt 2 und 3 kann man folgern:

a) Schimmelpilze können das Nitrit-Ion auch direkt, ohne vorhergehende Ammoniakbildung assimilieren.

---

[1]) Dieser Pilz ist der empfindlichste, besonders gegen Temperaturunterschiede, und in seinem Verhalten überhaupt unregelmäßigste der hier genannten Pilze, weshalb es eigentlich, von seiner leichten Unterscheidung von anderen Pilzen abgesehen, verwunderlich erscheint, daß er so gern zu ernährungsphysiologischen Versuchen, die sich bloß auf ihn beziehen, deren Resultate aber eine Verallgemeinerung finden sollen, herangezogen wird.

b) Das in Nitritnährlösungen entstehende Ammoniak ist wahrscheinlich teils als ein Produkt der erhöhten Reduktionsfähigkeit gut entwickelter (fruktifizierender) älterer Schimmelpilze, teils als ein sekundäres, durch Zersetzung stickstoffhaltiger organischer Substanzen entstehendes Produkt anzusehen[1]).

5. Die Versuche ergeben auch deutlich, daß nur fortgesetzte, zu verschiedenen Zeiten an ein und derselben sich weiter entwickelnden Zucht (event. Parallelzuchten) ausgeführte qualitative und quantitative Untersuchungen über derartige Ernährungsvorgänge der Pilze Aufschluß geben können: vereinzelte qualitative Untersuchungen sind für die Frage der Nitrat- und Nitrit-Assimilation und -Zersetzung durch Pilze (gilt natürlich auch für Bakterien und Hefen!) ziemlich wertlos. Bei der großen Empfindlichkeit der Ammoniakreaktion mit dem Neßlerschen Reagens ist aber ein Ausbleiben der Reaktion wohl ein Beweis für das Nichtvorhandensein von Ammoniak in einer Nährlösung zu einem bestimmten Zeitpunkte.

6. In den oben angeführten, sonst gleich zusammengesetzten Nährlösungen, in denen aber der Nitritzusatz in Wegfall gekommen war, die also keinen besonderen Stickstoffzusatz erhalten hatten, zeigten die zur Kontrolle eingeimpften Schimmelpilze auch nach längerer Zeit (4 bis 6 Wochen) entweder gar keine Entwicklung oder nur eine sehr geringfügige Flockenbildung, die mit der deutlichen Entwicklung in den Nitritnährlösungen (auch bei den schwächstentwickelten Pilzen) nicht zu vergleichen war. Das Wachstum der Schimmelpilze erfolgte also tatsächlich auf Kosten des Nitrits, was übrigens auch durch direkte quantitative Untersuchungen festgestellt wurde[2]).

Herrn W. Loew, der sich auch an den vorliegenden Untersuchungen beteiligt hat, danke ich hierfür bestens.

---

[1]) Auch die Assimilation des Luftstickstoffs und die Aufnahme der Luftstickstoffverbindungen kommen bei längerer Versuchsdauer in Betracht.

[2]) Hierüber folgt Näheres in der Abhandlung über Nitrat-Assimilation durch Hefen und Schimmelpilze.

Das Verhalten einiger Saccharomyzeten (Hefen) zu Inulin.

Von **V. Grafe** (Wien) und **V. Vouk** (Agram).

(Aus dem pflanzenphysiologischen Institute der k. k. Universität in Wien.)

Verhältnismäßig wenige höhere Pflanzen verfügen über das der so verbreiteten Amylase analoge Enzym Inulase, welches Inulin zu Lävulose abbaut, nämlich jene, in denen, wie beispielsweise in manchen Kompositen, Inulin als Reservestoff vorliegt. Inulasepräparate konnten daher von A. L. Dean[1]) aus Knollen von Helianthus tuberosus dargestellt werden. Verbreiteter ist dieses Enzym im Organismus der Pilze und Bakterien, was schon daraus hervorgeht, daß Wurzeln oder Knollen inulinführender Pflanzen von niederen Organismen beim Lagern befallen und ihrer Reservestoffe schließlich vollkommen beraubt werden. Besonders Aspergillus niger und Penicillium glaucum wurden reich an Inulase befunden. Da sich unter den Befallsorganismen, die wir an faulenden Wurzeln von Cichorium Intybus studierten, auch immer Hefen fanden, war es von Interesse, nachzuprüfen, ob Saccharomyzeten nicht nur imstande sind wie die Schimmelpilze, Inulin zu spalten und zu assimilieren, sondern auch zu vergären. Denn die ausgedehnten Versuche von P. Lindner[2]) haben ergeben, daß gärfähiger Zucker durchaus nicht assimiliert zu werden braucht und daß anderseits Zucker, der assimiliert werden kann, nicht auch vergoren werden muß. Zunächst wurde das Verhalten der Hefen in einer normalen Nährlösung geprüft, der reines Inulin zugefügt worden war. Die Kulturflüssigkeit enthielt: 9,1 g K_2HPO_4, 4,2 g $MgSO_4$, 10 g Pepton, 2000 g Wasser, 10 g Inulin. Das Inulin wurde in der Wärme zur Auflösung gebracht, indessen fiel ein Teil beim Abkühlen wieder aus, während der Rest durch die vor-

[1]) A. L. Dean, Botanic. Gazette, Bd. 35, 1903, S. 24.

[2]) P. Lindner, Wochenschr. f. Brauerei, Bd. 28, 1911, S. 61.

handenen Salze in Lösung gehalten wurde; in der abgekühlten Lösung ergab die Analyse das Vorhandensein von 0,32 % Inulin.

I. Versuchsreihe

vom 16. März 1913.

Hefeart	Kontrolle 26. März	Analyse am	Inulingehalt nach dem Versuch	Inulin verbraucht
Sacch. anomalus . . .	gut entwickelt	27. März	0,32	keines
„ ellipsoideus . .	schwach entwickelt	27. „	0,216	32,5 %
„ Logos	sehr schwach, am Boden des Kolbens liegend	28. „	0,28	12,5 %
Monilia candida . . .	mäßig entwickelt	28. „	0,288	3,7 %
Sacch. Johannisberg . .	schwach entwickelt	30. „	0,245	23,4 %
„ cartilaginosus . .	schwach entwickelt	30. „	0,225	30,0 %
„ turbidans . . .	gut entwickelt	30. „	0,342 (?)	keines
„ capsularis . . .	schwach entwickelt	1. April	0,32	keines
Pichia membranaefaciens	sehr schwach entwickelt	1. „	0,342 (?)	keines
Sacch. validus	schwach entwickelt	1. „	0,32	keines
Zygomyces priorianus .	sehr schwach entwickelt	2. „	0,32	keines

Aus dieser Zusammenstellung ist zu ersehen, daß sich die verschiedenen Hefearten dem Inulin gegenüber sehr verschieden verhalten, daß offenbar die einen über Inulase verfügen und sich darin der „Kojihefe“ (Asperg. Oryzae) analog verhalten, welche infolge des Besitzes von Amylase Reisstärke abzubauen und den gebildeten Zucker zu vergären vermag, die anderen nicht. Es ist ferner auffallend, daß im Durchschnitt diejenigen, welche Inulin vergären, schlechte Entwicklung, d. h. geringen Ansatz aufweisen, während die Inulin nicht vergärenden dieses Polysaccharid offenbar zu assimilieren vermögen. Vielleicht ist in manchen Fällen auch das Vorhandensein des sekundären Phosphates in der Nährlösung an der unvollkommenen Wirksamkeit der Inulase schuld, welche nach Dean am besten bei Anwesenheit schwacher H-Ionen arbeitet, während sie durch OH-Ionen schon stark gehemmt wird. Mit Rücksicht darauf wurde auch das sekundäre Phosphat für die Nährlösung gewählt, welches am beständigsten neutral ist und gegen Phenolphthalein auch neutral, gegen Lackmus aber immerhin schon alkalisch reagiert. Immerhin war es wünschenswert, die Versuche mit einer größeren Reihe von Hefearten anzustellen. Die Bestimmung von Lävulose und Inulin erfolgte nach der bereits in unseren früheren

Mitteilungen[1]) geschilderten Methode. Die Alkoholbestimmung wurde zunächst qualitativ nach Müntz[2]) und dann quantitativ durch Bestimmung des spezifischen Gewichts ausgeführt. Der Kolben mit der zu analysierenden Lösung wurde erhitzt, um etwa ausgefallenes Inulin in Lösung zu bringen, heiß filtriert, der Niederschlag mit heißem Wasser gewaschen (die Erwärmung wurde natürlich niemals bis zum Siedepunkte des Alkohols getrieben. In späteren Versuchen wurde, ohne von der Hefe abzufiltrieren, direkt aus dem Kolben abdestilliert, wobei durch geeignete Vorlagen ein Überspritzen durch Schäumen vermieden wurde) und das blanke Filtrat der Destillation unterworfen. Es wurden $^2/_3$ der Flüssigkeit abdestilliert, die zurückgebliebene Flüssigkeit zur Inulinbestimmung benutzt, das Destillat von neuem destilliert usf., bis auf 50 ccm, mit denen das Pyknometer beschickt wurde. Nach Berechnung des spezifischen Gewichtes im Destillate konnte aus den Hehnerschen Tabellen direkt der Alkoholgehalt abgelesen werden.

II. Versuchsreihe[3]).

Inulin-Nährlösung wie in der Versuchsreihe I. Aus der Reinkultur geimpft am 31. Mai 1913 und in einem Thermostaten bei 20—22° C aufgestellt. 23 Kölbchen zu 200 ccm Nährlösung[4]).

(Siehe die Tabelle auf Seite 330.)

In dieser Versuchsreihe, in der die Kulturen über längere Zeit ausgedehnt wurden, erscheinen die meisten der geprüften Hefearten als Verbraucher von Inulin, manche verarbeiten dieses Polysaccharid sogar in ganz erheblichem Maße, wie namentlich Schwanniomyces occidentalis, die schon P. Lindner als Inulinvergärer bezeichnet, ferner Torulaspora Delbrückii, Saccharomyces marxianus und Willia saturnia. Bei manchen ist es sicherlich auch eine geringere Widerstandsfähigkeit gegen den gebildeten Alkohol, welche der Vergärung des Zuckers ein Ziel setzt, und eine Weitervergärung ließe sich hier durch

---

[1]) Grafe und Vouk, Untersuchungen über den Inulinstoffwechsel bei Cichorium Intybus L. (Cichorie). Biochem. Zeitschr. Bd. 43, S. 424, Bd. 47, S. 320, Bd. 56, S. 249.

[2]) A. Müntz, Annal. de chimie et de phys. (5 sér.) T. 13, 1878, S. 543, nach W. Palladin in Abderhaldens Handbuch der Biochemischen Arbeitsmethoden, II, S. 509.

[3]) Die Hefereinkulturen bezogen wir von der Allgem. Versuchsstation f. Brauerei, Wien; wir möchten unserem verehrten Kollegen, Herrn Professor Dr. H. Zikes, für die besondere Sorgfalt danken, mit der die Reinkulturen für uns hergestellt wurden.

[4]) Diese Versuchsreihe wurde im botanisch-physiologischen Institut der Universität in Agram durchgeführt.

(Tabelle zu Seite 329.)

Hefeart	Entwicklung nach 10 Tagen	Entwicklung nach Tagen	Inulingehalt vorher g	Inulingehalt nachher g	Verbrauch in Proz.
Willia anomala	sehr gut	17; sehr gut	0,612	0,576	5,8
Sacch. marxianus . . .	„	19; „	0,612	0,140	77,1
Schwanniomyces occident.	gut	20; „	0,648	0,101	84,4
Debaryomyces globosus .	„	20; gut	0,648	0,450	30,6
Willia saturnia	sehr gut	21; sehr gut	0,648	0,162	75,0
Pichia halospora	sehr schwach	35; sehr schwach	0,648	0,648	keines
Schizosaccharom. Pombe .	schwach	21; schwach	0,648	0,520	20,0
Willia II	gut	23; gut	0,612	0,432	29,4
Saccharom. intermedia . .	schwach	23; schwach	0,612	0,486	20,6
Hansenia vini	sehr schwach	24; sehr schwach	0,612	0,522	1,5
Schizosaccharom. mellacei .	schwach	26; gut	0,648	0,316	51,2
Zygosaccharom. Barkeri .	„	30; sehr schwach	0,648	0,612	5,5
Willia I	sehr schwach	30; „	0,648	0,636	1,9
Torula alba	sehr gut	30; sehr gut	0,612	0,612	keines
Torulaspora Delbrückii .	gut	33; „	0,612	0,126	80,0
Saccharom. thermantitonum	schwach	33; gut	0,648	0,594	8,3
Pichia farinosa	gut; am Boden	33; „	0,612	0,612	keines
Oidum Ludwigii	schwach	33; schwach	0,612	0,522	1,4
Saccharom. glutinia . . .	gut	33; gut	0,648	0,594	0,9
Mycoderma rubra . . .	sehr schwach	35; sehr schwach	0,648	0,648	keines
Sacch. Kefyr	gut	35; gut	0,648	0,162	75,0
Sacch. ilicis	sehr schwach	35; sehr schwach	0,648	0,594	8,3
Blastoderma salminicolor .	„	35; „	0,648	0,630	2,8

Abdestillieren des Alkohols und neue Hefeeinsaat bewirken. Assimiliert scheint in dieser Versuchsreihe nur von einzelnen Hefen Inulin worden zu sein; in manchen Fällen tritt immerhin Entwicklung, wenn auch keine besondere, ein, obzwar kein Inulin verbraucht wurde, vielleicht geschieht das in diesen Fällen auf Kosten der in den Hefezellen enthaltenen Reservestoffe; im allgemeinen sieht man aber dort, wo kein Inulin verbraucht wird, auch kaum eine Entwicklung. Dagegen fand in der nächstmitgeteilten Versuchsreihe eine beträchtliche Verwendung des Inulins im Baustoffwechsel der Hefe statt, worauf einmal die üppige Vermehrung mancher Arten ohne gleichzeitig stattfindende starke Gärung und zweitens die verarbeiteten Inulinmengen hindeuten, die bei weitem die Mengen Inulin übertreffen, welche dem gebildeten Alkohol äquivalent wären. Zu diesen Versuchen wurden keine künstlichen Kulturlösungen

verwendet, sondern Zichorienextrakte. 300 g getrocknetes Zichorienpulver wurde mit 2000 ccm in der Hitze extrahiert, entsprechend verdünnt und je 500 ccm in einen Erlenmeyerkolben gegeben. Nachdem die ganze Reihe der Kolben aufgestellt war, wurden aus jedem Kolben je 100 ccm abpipettiert, mit Bleiazetat das Eiweiß und die färbenden Substanzen gefällt, im Filtrate das Blei durch die äquivalente Menge verdünnter Schwefelsäure entfernt und in einem aliquoten Teile des Filtrates vom Bleisulfat reduzierender Zucker und Inulin bestimmt. Die Kolben mit der restlichen Flüssigkeit wurden im Dampftopf sterilisiert, in üblicher Weise mit der betreffenden Hefe geimpft und im Thermostaten bei 26° C aufgestellt. Nach Ablauf des 14tägigen Gärungsversuches wurde der Alkohol in der oben beschriebenen Weise und im Rückstande Lävulose und Inulin bestimmt.

III. Versuchsreihe.

Kolben mit je 400 ccm Zichorienextrakt sterilisiert, am 17. März 1913 geimpft und bei 26° C im Thermostaten aufgestellt.

Hefeart	Kontrolle 26. III.		Vor dem Versuch		Nach dem Versuch		Alkohol	
	Entwicklung	Gärung	reduz. Zucker	Inulin	reduz. Zucker	Inulin	Vol.-Proz.	Gew.-Proz.
Sacch. Johannisberg .	gute	starke	2,952	6,920	1,26	0,936	1,27	1,01
„ Frohberg . .	„	„	2,952	6,920	0,70	1,800	3,07	2,45
„ anomalus . . .	starke	schwache	2,952	6,920	2,252	3,860	1,41	1,12
„ Carlsberg . .	schwache	„	2,952	6,920	0,750	3,150	2,09	1,67
„ Logos	„	„	2,952	6,920	1,350	2,385	5,78	4,63
„ Ludwigii . . .	gute	„	1,588	6,120	1,138	4,275	0,93	0,74
„ turbidans . .	„	mäßige	2,952	6,92	2,050	2,565	6,16	4,94
Pichia membranaefaciens	„	schwache	2,952	6,92	2,250	6,920	2,65	2,11
Mycoderma	„	sehr schwache	2,952	6,92	2,750	3,280	1,20	0,96
Sacch. exiguus . . .	schwache	keine	2,952	6,92	0,600	5,850	—	—
Monilia candida . . .	starke	sehr schwache	2,952	6,92	0,800	5,400	3,28	2,62
Zygomyces priorianus .	gute	sehr schwache	2,952	6,92	0,600	7,100(?)	1,34	1,06
Sacch. Saaz	„	schwache	1,588	6,12	0,250	3,185	4,58	3,66
Schizosacch. Pombe .	„	starke	3,280	4,104	2,296	2,2832	10,38	8,36
Schwanniomyces occid.	„	sehr schwache	3,280	4,104	1,640	4,104	—	—

Verarbeitet wurde in Prozenten von Lävulose und Inulin:

	reduz. Zucker	Inulin		reduz. Zucker	Inulin
Sacch. Johannisberg . .	57,3	86,47	Monilia candida . . .	73,0	22,0
„ Carlsberg	74,6	54,4	Schizosacch. Pombe . .	70,0	80,0
„ turbidans	30,5	62,9	Sacch. anomalus . . .	23,7	44,2
„ exiguus	73,0	15,5	„ Ludwigii . . .	28,3	30,1
„ Saaz	84,3	47,8	„ Mycoderma . . .	6,1	52,6
„ Frohberg	76,3	74,0	Zygomyces priorianus .	79,6	—
„ Logos	54,3	65,5	Schwanniomyces occid. .	50,0	100,0
Pichia membranaefaciens .	24,0	—			

Wenn es in der Rubrik „Gärung“ heißt „schwach, stark“ o. dgl., so bezieht sich das auf die Entwicklung von Gasblasen, aber es sagt eigentlich nichts über die Zerlegungsintensität des Zuckers aus; das geht am deutlichsten aus dem Befunde an Schwanniomyces occident. hervor, bei welchem 80% des reduzierenden Zuckers und sämtliches Inulin verarbeitet befunden wurde, trotzdem aber keine nennenswerte Kohlendioxyd-Entwicklung auftrat. Daß dabei andere Gärungsprodukte als Alkohol und Kohlendioxyd gebildet werden, geht schon aus dem Umstande hervor, daß bei Schwanniomyces trotz des enormen Kohlehydratverbrauches kein Alkohol gefunden wurde. Ferner aus der Tatsache, daß der Inhalt der Gärungskolben durchaus nicht immer weinige, sondern sehr verschiedene Gerüche aufwies, unangenehm faulig bei Willia anomala, eigenartig nach basischen Benzolderivaten bei Oidium Ludwigii, nach Azeton bei Pichia membranaefaciens usw.; obzwar, wie erwähnt, mit Reinzuchthefen gearbeitet und eine Fremdinfektion ausgeschlossen war. Immerhin sehen wir auch in dieser Versuchsreihe — wir möchten die Resultate als vorläufige betrachtet wissen, die nach verschiedener Richtung noch ergänzt werden sollen — bei manchen Hefen wie Sacch. Saaz, turbidans und Logos eine nennenswerte Alkoholbildung eintreten, die sicherlich auf die Verarbeitung von Inulin zurückzuführen ist, das im Gärgute der genannten Arten zu 47,8 bis 65,5% verschwindet. In anderen Fällen wie bei Schwanniomyces und Sacch. Johannisberg geht der Inulinverbrauch nicht mit der Alkoholbildung parallel, sondern ist wohl auf die Entstehung anderer Gärprodukte oder auf vollständige Verbrennung zurückzuführen, vielleicht, weil diese Hefearten im Gegensatz zu anderen Saccharomyzeten über ein größeres Arsenal von Oxydasen verfügen. Auf alle Fälle scheint es nicht gleichgültig, ob die Vergärung in künstlicher Nährlösung oder

in natürlichen Preßsäften erfolgt, wohl weil hier infolge Vorhandenseins von reduzierendem Zucker, spezifischen Eiweißstoffen u. dergl. besondere Anstöße nach der Richtung der Gärung oder der Entwicklung gegeben werden, wie überhaupt das gebotene Milieu von bestimmendem Einflusse qualitativ und quantitativ auf die Verfolgung dieser oder jener Tendenz der Hefearbeit wirken dürfte.

Aus den angeführten Versuchen geht hervor, daß die Vergärung und der Verbrauch von Inulin ein komplizierter Prozeß ist, bei dem nicht nur die Gegenwart des Inulins, sondern auch das übrige Milieu der Gärflüssigkeit, im besondern das Vorhandensein des hydrolssierten Produktes, eine Rolle zu spielen scheint. Wenigstens sehen wir in den Versuchen mit reiner Inulinnährlösung nur in einzelnen Fällen ein Verschwinden von Inulin, während in Zichorienextrakten, resp. überhaupt in natürlichen Pflanzenextrakten, in welchen u. a. auch Lävulose zugegen ist, die Verarbeitung des Inulins durch die meisten Hefen in erheblicher Weise vor sich geht. Wir halten dafür, daß durch unsere Versuche die nach dem Kleingärverfahren von P. Lindner gewonnenen Ergebnisse nach mancher Richtung hin ergänzt worden sind, da von dem genannten Forscher überhaupt nur die Gasentwicklung als qualitatives Kriterium herbeigezogen wurde, während wir durch quantitative Bestimmungen von Zucker und Alkohol gewisse von den untersuchten Hefen als typische Inulinverarbeiter charakterisieren konnten.

Auch bei den vorliegenden Untersuchungen hatten wir uns ebenso wie bei unseren Arbeiten über den Inulinstoffwechsel der Zichorie des weitgehenden Entgegenkommens der Herren Heinr. Franck Söhne, Linz, zu erfreuen, wofür wir der genannten Firma auch an dieser Stelle unsern verbindlichsten Dank ausdrücken möchten.

Referate.

Barker, B. T. P. Further Observations on Cider Sickness. Journal of the Instit. of Brewing. Vol. XIX, 1913, S. 58—73.

Die unter dem Namen „Ciderkrankheit“ bekannte Erscheinung zeigt einen ziemlich verschiedenen Verlauf, was die Ermittlung ihrer Ursachen bedeutend erschwert hat. Die Krankheit wird jetzt hauptsächlich auf einen bestimmten Mikroorganismus zurückgeführt. Die typischen Merkmale derselben werden wie folgt beschrieben. Zuerst zeigt der Cider eine Schaumdecke; kurz danach tritt plötzlich eine reichliche Gasentwicklung ein, und der süße Geschmack verliert sich. Fast gleichzeitig mit diesem Gärungsbeginn verändern sich das Aroma und der Geschmack; sie werden unangenehm scharf; der angenehme obstartige Charakter des Getränks geht verloren, und dasselbe fängt bald an trübe zu werden. Es kann jedoch von den angegebenen Krankheitssymptomen bald dieses bald jenes fehlen: die Gärung kann unterbleiben, Geschmack und Aroma können sich unverändert halten, und selbst die Trübung kann ausbleiben.

Verf. beschreibt näher die sich abspielenden chemischen Vorgänge. In dieser Beziehung ist namentlich zu bemerken, daß der Wasserstoffgehalt des entwickelten Gases bis 5% beträgt; im übrigen besteht es aus Kohlensäure. Auch die Ursache der Trübung wird erörtert.

Eine mikroskopische Untersuchung ergibt, daß, wenngleich sowohl lebende als tote Zellen verschiedener Mikroorganismen in der Flüssigkeit schweben, dieselben doch nicht in genügender Menge zugegen sind, um die starke Trübung erklärlich zu machen. Es finden sich auch ölige oder harzähnliche Tröpfchen massenhaft vor, teils einzeln, teils miteinander verbunden. Ihr Aussehen erinnert an Kokken. Was sie eigentlich sind, ist bis jetzt noch nicht festgestellt; sie scheinen zunächst durch die Einwirkung von Aldehyd auf die im Obstwein enthaltenen Gerbstoffe und verwandte Körper hervorgebracht zu werden.

Die Reinzüchtung des eingangs erwähnten Mikroorganismus war mit erheblicher Schwierigkeit verbunden, weil seine Entwicklung weit langsamer vor sich ging, als die verschiedener anderer, ebenfalls vorhandener Organismen; zuletzt gelang es jedoch, ihn zu isolieren, und er erwies sich als eine

kleine bewegliche, fakultativ anaërobe Bakterie, deren Wachstum am besten zwischen 25 und 30° C stattfand; die Minimaltemperatur für die Entwicklung beträgt 10—12° C. Die Zellen werden getötet, wenn man sie fünf Minuten einer Temperatur von 55° C aussetzt.

Des weiteren behandelt Verf. eingehend die Verschiedenheit des Verlaufs, welchen die Krankheit nehmen kann, in Beziehung auf Aroma und Geschmack, Trübung, Krankheitsgeschmack der Äpfel, das durch die Krankheit verursachte Schäumen; endlich schlägt er wirksame Maßregeln zur Abstellung des Übels vor.

Soweit bis jetzt bekannt, hat der Organismus seine eigentliche Heimat auf der Oberfläche der Äpfel, wohin er wahrscheinlich durch den Wind oder durch Insekten gelangt, welche ihn zusammen mit der Hefe dorthin getragen haben. Der Bazillus, welcher ebenso schädlich ist, wie die Hefe nützlich und notwendig, ist demnach wohl eine im Erdboden lebende Art.

Just. Chr. Holm.

Birckner, V. New Glycolytic Ferment of Yeast. Journ. Americ. Chem. Society, Bd. 34, 1912, S. 1213—1229.

Verf. hat in einer kalifornischen Hefe ein Enzym gefunden, welches imstande ist, bei einer hohen Temperatur die Glykose anzugreifen. Diese Hefe („steam beer yeast") ist eine Unterhefe, die Gärung wird aber bei einer hohen Temperatur (von 13 bis 18° C) geführt. Das Enzym kann aus der mit Äthylalkohol behandelten und getrockneten Hefe (Dauerhefe) ausgezogen werden. Wenn man das Enzym bei einer Temperatur von 70° C auf eine Glykoselösung einwirken läßt, nimmt diese eine zuerst rötlichbraune, später aber stark dunkelrote Farbe an und zeigt eine saure Reaktion; es bildet sich ein brauner kohleartiger Niederschlag und ein karamelartiger Geruch. Keine Gasentwicklung. Es entstehen hauptsächlich einige nicht näher bestimmte Säuren; gleichzeitig wird Pentose und Formaldehyd gebildet. Das Enzym (Glukase) ist in einer wässerigen Lösung bei gewöhnlicher Temperatur im sterilen Zustand sehr haltbar; die Wirkung wird durch Kochen nicht beeinflußt.

Just. Chr. Holm.

Zschokke. Die Herstellung alkoholfreier Getränke mit Kohlensäure. Schweizer Zeitschrift f. Obst- und Weinbau, 1912, S. 290.

Verf. bespricht die Versuche Böhis, wonach unvergorene Obst- und Traubensäfte, einem Kohlensäuredruck von 6—7 Atm. ausgesetzt, weder in Gärung kommen, noch sonstige stoffliche Veränderungen erleiden. Die Versuche sind bereits von der Praxis aufgenommen worden, welche starke Metallfässer mit indifferentem inneren Überzug verwendet. Die Fässer werden mit dem klaren unvergorenen Saft gefüllt und sofort einem Kohlensäuredruck von 5—7 Atm. ausgesetzt. Die vorhandenen Gärungserreger sterben nach und nach ab. Verf. betont den reinen Geschmack und das Fruchtaroma der den Gefäßen entnommenen Proben.

Harff.

Seifert, W. Versuche mit Kohlensäure behufs Verhinderung des Kahmigwerdens. Weinbau und Weinhandel, Bd. 30, 1912, Nr. 37.

Das schon länger empfohlene Verfahren, Zapfweine (Schankweine) durch Einleiten eines kontinuierlichen Kohlensäurestromes auf das sinkende Weinniveau vor dem Kahmigwerden zu schützen, zeigte sich bei der Verwendung einfacher Holzfässer nach den Versuchen als nicht zweckerfüllend, da durch Diffusion durch die Faßporen geringe Mengen Kohlensäure gegen Luft ausgetauscht werden, welche die Entwicklung von Kahmhefen herbeiführt. Die Versuche führten zum Ergebnis, daß nur bei Verwendung paraffinierter Holzfässer und gut schließender Kohlensäure-Leitungen der Zweck vollständig und ökonomisch erreicht wird. Harff.

Wortmann. Über den Einfluß der Temperatur auf den Geruch und Geschmack der Weine. Weinbau und Weinhandel, Bd. 30, 1912, S. 2—5.

Die Geruchs- und Geschmacksprobe des Weines ist wesentlich von der Temperatur für dessen Qualitätsbestimmung abhängig. Verf. gibt ein großes Material über die Komponenten des Weines, aus denen sich die Bouquetstoffe zusammensetzen, und welche den Geschmack bestimmen, in Beziehung auf die dabei einzuhaltende beste Weintemperatur. Er kommt zum Resultat, daß Weißweine sich am vorteilhaftesten bei 11° C, Rotweine bei 16,5° C proben lassen. Verf. hat ein kleines Taschenthermometer anfertigen lassen, auf welchem diese beiden Temperaturen angegeben sind.

Harff.

Meißner, R. Versuche über die Verwendung reingezüchteter württembergischer Weinhefen in der Praxis der Schaumweinbereitung. Aus d. VII. Jahresbericht d. k. Württ. Weinbau-Versuchsanstalt in Weinsberg.

Die Versuche wurden im Jahre 1909 mit einer größeren Menge Stillwein, der mit fünf württembergischen Hefen und einer Geisenheimer Champagne-Ay-Hefe in der Sektkellerei von Keßler-Eßlingen getrennt geimpft wurde, praktisch durchgeführt. Die württembergische Heferasse Weikersheim A, welche die Flaschengärung am besten durchführte, erwies sich bei der Kostprobe der fertigen Schaumweine in bezug auf Schaumbildung und Kohlensäure-Entwicklung, wie die Champagne-Ay-Hefe, als eine ganz vorzügliche, praktisch brauchbare Rasse. Harff.

Meißner, R. Die Behandlung säurereicher und säurearmer Weine unter besonderer Berücksichtigung des natürlichen Säureabbaues. Deutsche Küfer- u. Kellerei-Ztg., Bd. 9, 1912, S. 14. — **Anweisung für die Behandlung des 1912er.** Ebenda, Bd. 9, 1912, S. 20. — **Über die Behandlung der 1912er württembergischen Weine.** Württ. Wochenbl. f. Landwirtschaft, 1912, S. 711.

Die hohen Säuregehalte neben mittleren und geringen Öchslegewichten der 1912er württemb. Traubensäfte erfordern eine sorgfältige Kellerbehandlung der Säfte und Weine. Verf. empfiehlt das Aufrühren und Lüften der

Hefe unmittelbar nach der Hauptgärung, um die Weinpflanzen zur Säureverzehrung anzuregen und die Ausscheidung der löslichen Eiweißsubstanzen zu begünstigen. Der natürliche Säureabbau ist weiter durch eine erhöhte Kellertemperatur (14—15° C) und durch möglichst späten ersten Abstich, wenn nötig unter Luftabschluß und nur schwaches Einbrennen zu unterstützen, damit die säureverzehrenden Bakterien in ihrer Tätigkeit nicht gehindert werden. Künstlich ist die Säureverminderung der Weine durch eine sachgemäße nasse Zuckerung, durch Zusatz von kohlensaurem Kalk und schließlich durch einen Verschnitt mit anderem Wein zu erreichen. Verf. gibt ausführliche Ratschläge mit Beispielen hierfür im Sinne des Weingesetzes.

Harff.

Fred, E. B. A study on the quantitative reduction of Methylene Blue by bacteria found in milk and the use of this stain in determining the keeping quality of milk. Centralbl. f. Bakt. H. Abt. **35,** 1912, S. 391 bis 428 m. 17 Kurven.

Bei der Prüfung verschiedener Farben (Lakmus, Neutralrot, Fuchsin, Indigokarmin, Methylenblau) fand Verf. von neuem, daß sich die zuletzt genannte für die Reduktionsprobe am besten eignet. Die Lösung war die von Wichern angegebene: 1000 aq. dest., 1 Methylenblau pur. med. Grübler, 8,5 Kochsalz. Je 1 ccm wurde 10 ccm Milch oder Bouillon hinzugefügt. Der Verlauf der Reduktion wurde mit Hilfe der von Wichern ausgearbeiteten Titrationsmethode genau verfolgt. Gleichzeitig wurde die Keimzahl auf Heidenagar ermittelt. Geprüft wurden 22 Reinkulturen: verschiedene Milchsäurebakterien (in den Tabellen gibt es wieder einmal ein arges Durcheinander von Bact. acidi lactici und lactis acidi), Formen aus der Coli-Aerogenes-Gruppe, B. fluorescens, prodigiosus, subtilis, mycoides, mesentericus, Proteus, Bact. denitrificans, Oidium lactis. Bis auf Micrococcus citreus reduzierten alle und zwar in Milch rascher als in Bouillon. Auch die Milchsäurebakterien reduzierten relativ rasch. Die den Verlauf der Reduktion und der Keimvermehrung zeigenden Kurven sind fast gleich. Da aber auch in mit 5% Toluol versetzter Milch, in der das Bakterien-Wachstum unterdrückt war, Reduktion stattfand, handelt es sich nach Verf.s Ansicht um Enzymwirkung. Desgleichen zeigten Versuche in gefärbtem Agar sowie die Reduktion innerhalb eines in die reduzierende Milchkultur eingehängten Kollodiumsackes, daß intra- wie extrazelluläre Produkte an dem Prozeß beteiligt sind.

Löhnis.

Belonowski, G. D. Zur Frage über die Säureproduktion der bulgarischen Milchsäure-Mikroben. Milchw. Zentralbl. **41,** 1912, S. 449—454.

Zugaben von 1—35% Trauben-, Milch- oder Rohrzucker zur Milch verzögerten Säurebildung und Koagulation. Bei Jaourt-Laktobazillen wirkte bereits 1%, bei Milchsäure-Streptokokken erst 5% deutlich hemmend. Ein

Zuckerzusatz ist nützlich, weil er zu intensive Säuerung hindert, die Lebenskraft der Laktobazillen aber nicht beeinträchtigt. Löhnis.

Skar, O. Eine schnelle und genaue Methode für Zählung von Bakterien und Leukozyten. Milchw. Zentralbl. **41,** 1912, S. 454—461.

10 ccm Milch werden im Reagenzglas mit $^4/_{10}$ ccm 2proz. Karbol-Methylenblau rasch vermischt und 5—10 Minuten bei 70° C gehalten. $^1/_{50}$ ccm verteilt man auf einer 20 × 24 mm großen Fläche des Objektträgers möglichst gleichmäßig und zählt nach dem Antrocknen (ohne Fixieren) 10 bis 20 Gesichtsfelder unter Benutzung eines besonderen Okular-Mikrometers (von Zeiß) aus. Saurer Milch ist die erforderliche Menge Natronlauge hinzuzusetzen. Bei der mikroskopischen Zählung, die beim Vergleich mit der (augenscheinlich nicht ganz korrekt gehandhabten) Plattenmethode bis 69-mal so hohe Zahlen lieferte als diese, kann nach Verf.s Vorschlag die Größe der vorhandenen Bakterien und Bakterien-Konglomerate in der Weise in Rechnung gestellt werden, daß als Einheit ein Mikrokokkus von 1 μ Durchmesser angenommen und danach der „berechnete Bakterien-Gehalt" festgestellt wird. Auch für die Schleuderprobe ist vorheriger Farbzusatz empfehlenswert.

Löhnis.

Gooren, G. L. J. Hygienische Untersuchungen der Handelsmilch. Centralbl. f. Bakt. II. Abt. **35,** 1912, S. 625—646.

Je 10 Proben holländischer „Mustermilch" (Vorzugsmilch) und sogen. „Reformmilch" (gewöhnliche Flaschenmilch) wurden in bezug auf chemische Zusammensetzung, Säuregrad, Katalase-, Peroxydase-, Reduktase- und Diastase-Reaktion, Schmutz- und Bakteriengehalt, sowie hinsichtlich der Gefrierpunkts-Erniedrigung untersucht.

Die Katalasezahl war in 10 Fällen abnorm hoch; 9 mal handelte es sich um Milch aus entzündeten Eutern, 1 mal um solche mit abnorm hohem Bakteriengehalt. In 2 Fällen war aber die Katalasezahl normal, obwohl Mastitismilch vorlag. Die Katalaseprobe allein genügt also nicht; die mikroskopische Untersuchung des Sedimentes muß stets hinzutreten. Alle andern Enzymreaktionen gaben bis auf nur einen Fall normale Werte (!); dieser eine (pathologische) Fall war schon durch die mikroskopische Prüfung sichergestellt. Auf dem zuletzt genannten Wege konnte in 3 von den 10 Vorzugsmilchproben und in 8 von den „Reformmilch"proben Mastitismilch nachgewiesen werden. Der Keimgehalt wurde auf Gelatine für die Vorzugsmilch zu 4050—27 900, für die Reformmilch zu 50 100—1 440 000 pro ccm ermittelt. Die Zuverlässigkeit dieser Befunde scheint nicht einwandfrei; u. a. ruft die Angabe, daß stets nur 3—5 verschiedene Arten zur Entwicklung kamen, einige Bedenken wach. Verf. steht aber nicht an, auf Grund seiner 10 (!) Bestimmungen zu fordern, daß die nach dem holländischen Codex alimentarius für „Mustermilch" zulässige Höchstzahl von 50 000 auf 25 000 pro ccm herabzusetzen sei.

Löhnis.

Wolff, A. Säuerungsbakterien, insonderheit Milchsäurelangstäbchen und Propionsäurebildner in Molkereiprodukten, speziell in den verschiedenen Käsesorten. Centralbl. f. Bakt. II. Abt. **34,** 1912, S. 494—540 mit 18 Textfig.

Aus verschiedenen Käsen (Backstein-, Camembert-, Edamer, Harzer, Gouda- und Tilsiter Käse), sowie aus Milch, Butter, Säurewecker und frischem Labpulver wurden eine größere Zahl Laktobazillen und verschiedene Propionsäurebildner isoliert, die teils den Laktobazillen, teils den Milchsäurestreptokokken nahestehen. Die isolierten Stämme werden ausführlich beschrieben und das Aussehen der Kolonien und der Ausstrichpräparate z. T. im Bilde vorgeführt. Manche der Laktobazillen wuchsen auch noch bei 20° C. Nicht wenige der Kulturen waren durch ein spezifisches Aroma ausgezeichnet. Übergänge nach der Streptokokkengruppe sowie zu den Essigbakterien wurden gelegentlich beobachtet; speziell das „Stäbchen Nr. 20“ scheint eine interessante Zwischenstellung einzunehmen. Für Nr. 22 und 24 wird Eigenbewegung angegeben. Am eingehendsten wurde die Mikroflora des Edamer Käses bearbeitet. Im ganzen wurden in diesem Falle 64 Organismen isoliert, darunter eine Milchzucker vergärende Hefe, ein Säure-Lab-bildender Streptokokkus, ein säurebildender Mikrokokkus sowie 28 Laktobazillen und Propionsäurebildner. Aus gut geformten Augen wurde ein wahrscheinlich mit B. casei γ identischer Stamm gezüchtet, der durch Milchzucker- und (oder?) Laktat-Vergärung für die Augenbildung in dieser Käsesorte von einiger Wichtigkeit zu sein scheint. In altem Labpulver fehlten die Laktobazillen. Milchkulturen der gewöhnlichen Milchsäurestreptokokken wurden noch nach 5 Monaten schwach lebensfähig befunden. Ein Stamm von Bact. Mazun ging zur Schleimbildung über und verwandelte die Milch in einen glasig-gelatinösen Kuchen. Löhnis.

Schnell, E. Die auf Produkten der Landwirtschaft und der landwirtschaftlichen Gewerbe vorkommenden Oospora (Oidium) lactis-Varietäten. Centralbl. f. Bakt. II. Abt. **35,** 1912, S. 1—76 mit 6 Tafeln.

Zirka 100 Stämme wurden unter Verwendung von Bierwürze von Getreide, Heu, Erde, Dünger, aus Stallluft, Milch und Molkereiprodukten, Hefen, Grünmalz, eingesäuerten Gurken usw. angehäuft und auf Würze-Gelatine oder -Agar isoliert. Nach der Kolonieform waren 30 Kulturen deutlich zu unterscheiden. Von den verschiedenen Oidium lactis-Varietäten wird ein Oidium casei als neue Art abgetrennt.

Nach den morphologischen werden die physiologischen Merkmale näher geschildert, speziell die Gelatineverflüssigung, Ammoniakbildung, Lipase-, Katalase- und Zymase-Produktion, Alkohol-Assimilation, Bildung und Verbrauch von Säure (die in Übereinstimmung mit Rullmanns Befunden einander folgen) sowie Licht- und Temperaturempfindlichkeit (Optimum bei 23 bis 28° C). Der Käsestoff der Milch wurde von allen Stämmen, wenn auch

in sehr verschiedenem Grade unter Gelb-Braunfärbung des alkalisch werdenden Serums gelöst, gleichzeitig wurde ein pikanter Käsegeschmack bemerkbar. Das Fett wird stark verändert und es bilden sich zahlreiche Kristallnadeln eines nicht näher bestimmten Eiweißabbauprodukts, Säurekasëin wird rascher zersetzt als Labkasëin, in dem zunächst Säuerung Platz greift. Lebende Kartoffeln sowie Gurken werden erweicht. Die Zellwände werden vom Myzel durchwuchert, Ammoniakbildung ist wahrnehmbar, dagegen wird die Stärke nicht angegriffen. Löhnis.

Harrison, F. C. and Savage, Alfr. The bacterial content of the normal udder. Rev. génér. du lait **9,** 1912, S. 121—131.

Es wird erneut konstatiert, daß die Kuhmilch auch dann in der Regel keimhaltig ist, wenn sie dem sorgfältig desinfizierten Euter mittels sterilisierter Melkröhrchen entzogen wird. Fast ausnahmslos handelt es sich um weiße und gelbe Mikrokokken, die in der Regel harmlos sind und keine erhebliche Einwirkung auf die Qualität der Milch ausüben. In den zuerst entnommenen Milchproben fanden sich z. T. auch andere Arten (Milchsäurebakterien, sporenbildende Bazillen u. a.) Im Drüsengewebe selbst konnten die Mikrokokken gleichfalls nachgewiesen werden, die nach Ansicht der Verff. von der Blutbahn aus in das Euter eintreten. Löhnis.

Golding, J. Yellow discoloration of Stilton cheese. Journ. Board of Agriculture **19,** 1912, S. 177—186 mit 1 Tafel.

Bei zu starkem Salzen entstehen namentlich in Naturlabkäsen nicht selten gelbe, weiche Flecke. Die Azidität bleibt abnorm niedrig, statt der erwünschten Pilze entwickeln sich ungewöhnlich viel Bakterien, unter diesen zahlreiche Tyrosinasebildner. Die fehlerhaften Stellen sind reich an Tyrosin, durch die Tyrosinase wird Dunkelfärbung bewirkt. Löhnis.

Gorini, C. Studien über die rationelle Herstellung des Parmesan- (Grana-) Käses. 3. Bericht. Centralbl. f. Bakt. II. Abt. **36,** 1912, S. 42—53, Milchw. Zentralbl. **41,** 1912, S. 641—650.

Besonders durch die „Associazione Pro Grana" ist die Erkenntnis von dem Nutzen einer einwandfreien Gewinnung und Behandlung der Milch und der Verwendung von Käse-Reifungskulturen in immer weitere Kreise getragen worden. Die Zahl der abgegebenen Kulturen stieg in den Jahren 1906 bis 1911 von 2276 auf 11 609 (je 1 Dosis ist für 500 l Milch bestimmt). Außer in der Grana-Käserei sind die Kulturen ebenfalls mit Vorteil bei der Herstellung des Lodisaner, Reggianer, Montasio, Bitto, Branzi und Cacio cavallo benutzt worden. Löhnis.

Clark, W. M. A study of the gases of Emmental cheese. U. S. Dept. Agric. Bur. Anim. Ind. Bull. **151,** 1912, ref. Rev. génér. du lait **9,** S. 279.

Das in den Augen eingeschlossene Gas besteht in der Regel ausschließlich aus CO_2 und N. Nur in geblähten Käsen tritt H aus der Milchzucker-

gärung hinzu. Ein Vergleich der Mengen an CO_2 und Fettsäuren erwies, daß die Propionsäurebakterien allein nicht sämtliches CO_2 gebildet haben können. Nach spezifischen CO_2-Bildnern wird noch gesucht. Löhnis.

Keil, F. Beiträge zur Physiologie der farblosen Schwefelbakterien. Beitr. z. Biol. d. Pflanzen, Bd. 11, 1912, S. 335—372.

An Reinzuchten von Thiothrix und Beggiatoa konnte nachgewiesen werden, daß es sich sicher um rein autotrophe Organismen handelt. Als N-Quelle fungieren Ammonsalze, als C-Quelle allein CO_2. Organische Stoffe können zwar in ziemlich hoher Konzentration zugegen sein, ohne zu schaden; genutzt wird indessen der darin enthaltene Kohlenstoff nicht. Löhnis.

Noack, K. Beiträge zur Biologie der thermophilen Organismen. Jahrb. f. wissensch. Botanik, Bd. 51, 1912, S. 593—648.

Es wurde speziell das Verhalten von thermophilen Bakterien, Pilzen und deren Sporen gegen subminimale Temperaturen geprüft. Die Schädigung ist bei sporenfreiem Material im allgemeinen recht erheblich. Z. B. starb B. calfactor (im vegetativen Zustande) bei 5—6° C schon nach 16 bis 20 Stunden ab. Eine Herabsetzung des Temperatur-Minimums konnte bei Kultur in Erde (entgegen A. Koch und C. Hoffmann) nicht konstatiert werden. Auf erwärmtem Heu wurde u. a. Anixia spadicea Fuckel angetroffen (Temperatur-Minimum 27°, Maximum 58° C). Löhnis.

Kroulik, A. Über thermophile Zellulosevergärer. Vorläufige Mitteilung. Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 36, 1912, S. 339—346.

Entweder wurde Papier direkt mit Erde, Mist, Schlamm usw. in Petrischalen bei 60—65° C aufgestellt oder es wurden zunächst in bekannter Art aërobe und anaërobe Anhäufungskulturen (in modifizierter Omelianski-Lösung) angesetzt. Am raschesten, nach 1½—3 Tagen, trat die Zersetzung unter aëroben Bedingungen bei Verwendung von Stallmist, Fäces, Komposterde und dergl. ein. Anaërob verlief der Prozeß etwas langsamer, doch vollständiger. Trotz reichlicher Überimpfung versagten die folgenden Kulturen nicht selten gänzlich[1]). Reinzuchten der Zellulosezersetzer konnten nicht erhalten werden, doch gelang es Verf. unter anaëroben Bedingungen zu ziemlich reinen Kulturen zu kommen. Sowohl die thermophilen Zellulosezersetzer wie die Begleitbakterien bilden Sporen. Das Temperaturoptimum wurde bei 55—60° gefunden, das Maximum bei 68°, das Minimum bei 30° C. Aërob entstand neben Ameisen-, Essig- und Buttersäure nur CO_2, anaërob außerdem H, kein CH_4. Die Rohkulturen der Zellulosezersetzer vergoren auch Glukose sehr lebhaft. Aërob wurde das Papier gewöhnlich gelb gefärbt, anaërob blieb es farblos. Löhnis.

---

[1]) Weit zweckmäßiger und auch den natürlichen Verhältnissen besser angepaßt ist es, statt überzuimpfen, nur die Lösung wiederholt zu erneuern und nach Bedarf von neuem Zellulose hinzuzufügen. Man kommt so zu sehr aktiven Rohkulturen. Ref.

Kendall, A. J. and Farmer, Ch. J. Studies in bacterial metabolism. VII. Journ. Biol. Chem., Vol. 13, 1912, p. 63—70, w. 9 curves.

Verff. prüften Ammoniak-, Alkali- und Säureproduktion in Bouillon- und in Zuckerbouillon-Kulturen von B. proteus, coli, paratyphus, typhosus, alcaligenes, Vibrio H. 61, Microc. aureus und Streptococcus Nr. 34. Dextrose-Gegenwart hemmte die Ammoniakbildung meist deutlich. Ohne Zucker wurde die Reaktion in der Regel alkalisch, mit Zucker sauer. Nur B. alcaligenes und Vibrio H. bildeten stets Alkali, Streptococcus Nr. 34 stets Säure.

Löhnis.

Thöni, J. und Thaysen, A. C. Micrococcus mucofaciens, ein Milchschädling. Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 36, 1913, S. 359—365.

Der Gelatine sehr langsam verflüssigende, Milch schwach säuernde und peptonisierende, gelbliche Micrococcus wurde aus fadenziehender Milch isoliert. Er macht speziell den Rahm sehr schleimig; die infizierte Milch ist nicht gesundheitsschädlich. Die morphologischen und kulturellen Merkmale werden ausführlich mitgeteilt. Löhnis.

Gminder, A. Untersuchungen über Mastitis-Streptokokken und ihre Differenzierung von saprophytischen Streptokokken. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Orig., Bd. 63, 1912, S. 152—193.

Der Befund bei der Trommsdorff-Probe ist nur dann entscheidend, wenn die Milchprobe aseptisch entnommen und das Zentrifugat mikroskopisch untersucht wurde. Bei nicht aseptisch gewonnener Milch ist keine sichere Entscheidung möglich, da weder die mikroskopische noch die kulturelle Prüfung noch auch der Impfversuch eine einwandfreie Differenzierung der Streptokokken verschiedener Herkunft gestatten. Speziell können auch die Milchsäure-Streptokokken die sog. „Staketform“ annehmen. Wahrscheinlich sind alle Streptokokken imstande, Mastitis hervorzurufen, wenn sie in genügender Zahl in das Euter gelangen, und dieses ihnen (bei Frisch-Milchendsein, fieberhafter Schwächung usw.) einen geeigneten Aufenthaltsort bietet. Namentlich gilt dies in bezug auf die weitverbreiteten Colpitis-Streptokokken.

Löhnis.

Budinow, L. Zur Physiologie des Bacterium lactis acidi. Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 34, 1912, S. 177—187.

Sowohl die Säurebildung wie der Zuckerverbrauch waren in Milch erst nach 6 Stunden nachweisbar. Nach 18 Stunden begann die Zahl der Milchsäurebakterien zu sinken, die Säure nahm weiter zu. Zirka 2 % des umgesetzten Zuckers kam bei der Titration nicht als Säure zum Vorschein. Bei 28—32° C starben sämtliche Bakterien in 9—15 Tagen ab, bei 12—21° fand innerhalb 30 Tagen ein starker Rückgang statt, bei 0 bis —17° C war in dieser Zeit keine Abnahme wahrnehmbar. Gefrieren und Auftauen schadet nichts. Löhnis.

Register der Personennamen.

(Die Literaturliste auf Seite 272 wurde nicht miteinbezogen.)

Alphabetisches Sachregister.

(Die Literaturliste auf Seite 272 wurde nicht miteinbezogen.)

Soeben erschien:

Einführung in die Mykologie der Gebrauchs- und Abwässer

von **Professor Dr. Alexander Kossowicz.** Mit 62 Textabbildungen. In Ganzleinen gebunden 7 Mk. 60 Pfg.

Das vorliegende Werk bringt eine kurze, dabei überaus klare und leicht verständliche Darstellung der zur Reinigung des Wassers und Abwassers gebräuchlichen Methoden unter besonderer Berücksichtigung der Bakteriologie bezw. Mykologie der Gebrauchs- und Abwässer. In der Einleitung werden die Aufgaben und Ziele der Wassermykologie besprochen. Die weiteren Kapitel beschäftigen sich mit dem Keimgehalt des Wassers, dem Vorkommen pathogener Bakterien im Wasser, der Selbstreinigung der Gewässer, der Reinigung des Wassers durch das Absitzverfahren (Klärbecken, Klärtürme, Klärbrunnen, Travisbecken, Emscherbrunnen), die chemische Fällung, Schnellfilter, das Faulverfahren, die Sandfiltration, Kleinfilter, Rieselfelder, intermittierende Bodenfiltration, das Spritzverfahren, Fischteichverfahren, biologische Füllkörper und Tropfkörper, das Nitratverfahren, Tonreinigungsverfahren, chemische Desinfektionsmittel (besonders Ozon), Elektrizität, ultraviolettes Licht. Ein Kapitel behandelt den gegenwärtigen Stand der Reinigung industrieller Abwässer, ein weiteres ist der mykologischen Wasseruntersuchung gewidmet. Ein sehr ausführliches Sachregister und ein Verzeichnis der Autornamen bilden den Schluß des Werkes.

Buchdruckerei E. Buchbinder (H. Duske) Neuruppin.